

Université Lille - Nord de France
Université du Droit et de la Santé de Lille II

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

PAPEGAEY Anthony

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE II

Spécialité: Neurosciences

**DEGENERESCENCES LOBAIRES
FRONTOTEMPORALES :**

- VERS UNE NOUVELLE CLASSIFICATION

- VERS DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS

Soutenue publiquement le 19 Décembre 2016 devant le jury composé de:

M. le Dr. Luc DUPUIS

Rapporteur

M. le Pr. Jean-Pierre BRION

Rapporteur

Mme le Dr. Isabelle LE BER

Examinatrice

M. le Pr. Vincent DERAMECOURT

Examineur

Mme le Dr. Valérie BUEE-SCHERRER

Directrice de Thèse

Remerciements

Pour débiter, je remercie les membres de mon jury, le **Dr. Luc DUPUIS**, le **Pr. Jean-Pierre BRION**, le **Dr. Isabelle LE BER**, le **Pr. Vincent DERAMECOURT** et le **Dr. Valérie BUEE-SCHERRER** qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'appartenir à ce jury de thèse et d'examiner ce travail. Je remercie tout particulièrement le **Dr. Luc DUPUIS** et le **Pr. Jean-Pierre BRION** pour avoir accepté d'endosser le rôle de rapporteur et pour leur évaluation minutieuse de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier le **Dr. Luc BUEE** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche « Alzheimer & Tauopathies » pendant mon master et ma thèse. Malgré vos nombreuses responsabilités, vous avez toujours su trouver le temps de suivre mes travaux de recherche tout au long de ces quatre années. Je vous remercie notamment pour mon pic de stress mensuel lors de nos réunions du mercredi matin, vous avez à coup sûr votre part de responsabilité dans l'augmentation du nombre de mes cheveux blancs ! Néanmoins, ces réunions ont toujours été extrêmement enrichissantes pour moi grâce à vos conseils avisés et, d'une certaine manière, je me sentais rassuré et moins paranoïaque lorsque vous émettiez les mêmes doutes que moi sur le projet. Finalement, je vous remercie aussi pour votre fameuse soupe de Noël, toujours très revigorante ☺ !

La majeure partie de mes remerciements vont bien évidemment au **Dr. Valérie BUEE-SCHERRER** qui m'a encadré et supporté depuis mon stage de master 1. Tout d'abord merci de m'avoir fait confiance lors du M2 et de cette thèse, malgré ma faible capacité à communiquer au début de ce projet ! Un grand merci également pour m'avoir fait assister à différents congrès (notamment l'ADPD), pour m'avoir impliqué dans la collaboration avec l'ICM et finalement pour m'avoir permis d'encadrer différents étudiants. Malgré vos très lourdes charges d'enseignements, vous avez toujours su vous rendre disponible lorsque j'avais besoin de conseils ou pour débriefer sur les résultats. Déterminer si cette réduction des protéines Tau était pertinente aura été un chemin semé de doutes mais vous êtes toujours restée optimiste (ou au moins vous avez fait semblant pour que je ne sombre pas dans le désespoir ^^) et vous avez su me guider et me remotiver dans les périodes sombres inhérentes à tout travail de recherche. A travers nos différentes réunions, j'ai énormément appris tant sur le plan scientifique que pédagogique grâce à vos remarques constructives. Régulièrement, je me rends d'ailleurs compte que je donne les mêmes conseils que vous m'aviez prodigué tout au long de ma thèse. J'espère aussi faire moins de fautes d'orthographe grâce à vous mais maintenant je peux vous l'avouer, j'en laissais toujours quelques-unes pour que vous gardiez la main ^^ (je plaisante bien sûr). Je vous remercie aussi pour votre sympathie, même

si vous savez que j'aurais toujours peur de vous :-p. Il me reste qu'à vous souhaiter une bonne continuation à la fois au sein du laboratoire et en dehors ☺. Merci pour tout.

Je vais également remercier les docteurs **Isabelle LE BER, Vincent ANQUETIL, Charles DUYCKAERTS, Magalie LECOURTOIS** ainsi qu'**Agnès CAMUZAT** pour leur collaboration sur le projet. Je remercie aussi **Hervé DROBECQ** pour m'avoir initié à l'art occulte de la spectrométrie de masse, toujours dans la bonne humeur.

Mes remerciements vont ensuite au **Dr. Nicolas SERGEANT** qui a largement participé au bon déroulement de ce projet de thèse. Merci de vous être autant impliqué sur ce projet, vos idées, vos remarques ainsi que votre expertise ont toujours été d'une grande aide. Votre duo avec Valérie lors des réunions hebdomadaires restera dans ma mémoire, pour le meilleur et pour le pire ! Enfin, je vous remercie évidemment d'avoir choisi Caroline comme thésarde ☺.

Merci également aux docteurs **Malika HAMDANE, Morvane COLIN, Vincent DERAMECOURT, David BLUM, Claire-Marie DHAENENS, Valérie VINGTDEUX, Bruno LEFEVBRE Marie-Christine GALAS, Sandrine HUMEZ, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN, Bernard SABLONNIERE** et **Susanna SCHRAEN** pour leurs remarques pertinentes pendant les réunions d'équipe et pour leur soutien. Je remercie particulièrement **Bruno** pour ces conseils, ces taquets quotidiens et les discussions qu'on a pu avoir sur le plan scientifique ou personnel ☺. Maintenant je peux vous l'avouer, c'est moi qui ai saboté « votre » PSM avant de partir !

Je vais aussi remercier des anciens, notamment le **Dr. Francisco Jose FERNANDEZ-GOMEZ** qui m'a appris (avec **Hélène**, je ne t'oublie pas !!) les arcanes de la 2D-DIGE. Ta capacité à modifier les règles d'hygiène et sécurité à ton avantage m'impressionnera toujours. Tu es vraiment une personne en or et j'ai adoré travaillé avec toi. Longtemps, tu as été mon voisin de bureau (celle qui t'as remplacé n'a pas les mêmes qualités athlétiques sois en sûr) et j'ai vraiment apprécié nos différentes discussions scientifiques ou moins scientifiques. Merci aussi pour les soirées **KARMELIET + FOOT**, un combo toujours gagnant ! J'espère qu'on aura l'occasion de se recroiser mais ne compte pas sur moi pour aller manger du poulpe devant une « corrida de torros » (c'est important le « de torros », maintenant je le sais ☺). **Maxime et Simon**, je vous remercie pour la bonne ambiance que vous avez apportée au sein du laboratoire. Vos blagues graveleuses et vos expériences douteuses (alors il y a de la Tau dans l'araignée ?) étaient un vrai plaisir ! **Cyril**, ça a été un plaisir de t'avoir comme voisin de bureau pendant 6 mois. Merci de m'avoir fait reprendre le sport, même si je ne savais plus bouger le lendemain du cours de training ! **Antoine**, merci pour tes discussions sur l'orpaillage, je suis sûr qu'une grande carrière t'attend (j'ai transmis ton livre de

génétique à Caroline si tu le cherches) ! Je remercie finalement à **Fanny, Marie V., Céline C.** et **Meliza** pour leur bonne humeur et leurs blagues pourries.

Je tiens également à remercier les personnes qui gèrent notre quotidien et qui nous simplifient énormément la vie; je pense évidemment à toute l'équipe du secrétariat : **Céline BRAND, Sophie LESAGE, Nathalie PERRAIS, Michèle REVEZ** et **Staëlle CORVO-CHAMAILLARD**. Tes danses endiablées me manqueront **Sophie** (je suis certain que Francisco pense la même chose !). Votre sympathie et votre professionnalisme nous permettent de travailler dans les meilleures conditions possibles au sein du JParc. Merci aussi à **Laëtitia**, notre responsable communication, pour son travail de titan concernant l'organisation d'événements mais également pour nous donner l'occasion de faire découvrir notre métier au grand public. Tu es une fille adorable et je te souhaite le meilleur pour la suite ! Je n'oublierai pas non plus notre duo, **Thomas** et **Karim**, toujours de bonne humeur et qui s'assurent que nous disposions toujours d'un cône propre au bout de notre pipette (amateurs d'humour graveleux je vous attends !).

Alban... honnêtement cette thèse n'aurait pas été aussi « enjaillante » sans toi. Tout au long de ces quatre années, tu as été d'un grand soutien et tu m'auras beaucoup aidé à affronter les différentes épreuves de ce parcours du combattant qu'est la thèse. Je n'oublierais pas nos longues discussions sur diverses questions vitales telles que la meilleure façon pour survivre à un saut en avion sans parachute. Je n'oublierais pas non plus nos nombreuses pauses café ou nos débats de sujets d'actualité (on se rappellera notamment cet article sur un homme abattu de 46 balles pour avoir demandé un « pain au chocolat » à Toulouse). Je te remercie aussi pour ton respect stricte des deadlines, grâce à toi j'avais toujours l'impression d'être en avance ! Merci aussi pour m'avoir fait découvrir plein de musiques has been (vive Michel Forever). Clairement, tu es quelqu'un qui a le cœur sur la main (parfois trop) et tu fais partie de ces personnes qu'on ne peut qu'adorer et sur qui je sais que je pourrais toujours compter. Tu es un véritable bosseur qui mérite vraiment de réussir professionnellement et j'espère qu'on aura l'occasion de se retrouver au Canada et pourquoi pas de travailler ensemble ☺. En attendant, on se retrouvera dans les bars ! Je terminerais par lancer un appel à tout le laboratoire : saurez-vous retrouver l'ongle d'Alban ;-)?

Vanessa, ma partenaire de M1 ! Tu sais, quand je disais Flaten vas t'en, il ne fallait pas le prendre au premier degré ... Blague à part, je suis très content de voir que tu es pleinement épanouie dans la voie que tu as choisie, même si tu nous as abandonné Alban et moi... Néanmoins, j'espère que tu ne pleureras pas aussi facilement devant les présentations de tes élèves que devant les miennes (j'étais si mauvais que ça ??). J'ai adoré tous nos moments à l'intérieur ou à l'extérieur de

laboratoire, te voir minable après 25 cl de Karmeliet était toujours très amusant ! Je te souhaite bon courage pour la nouvelle vie qui t'attend ☺.

Coline, je commencerais en disant que tu es le parfait exemple qui montre qu'on peut faire de la science et savoir s'habiller (désolé **David**, même si j'adore vos t-shirts) ! Ensuite, je tiens à sincèrement de remercier pour m'avoir soutenu tout au long de ma thèse, j'ai toujours pu compter sur toi. Ta gentillesse est à la mesure de ton amour pour les grosses voitures, c'est peu dire. Pourtant, notre histoire commençait mal : lorsque nos bureaux étaient encore dans le grand labo, tu étais plutôt chauffage réglé à fond et moi pas du tout. Heureusement, le destin a bien fait les choses et nous avons été transférés dans le « bureau du fond » où chacun a pu trouver une place à une distance du chauffage qui lui convenait ! Ça a été un vrai plaisir de t'avoir comme voisine de bureau pendant tout ce temps, et pourtant tu avais la lourde tâche de succéder à Francisco ! Tous les deux, on a bravé mille dangers, de la bonbonne de CO₂ à l'azote liquide en passant par les bains d'acide sulfurique (comment ça j'exagère ?). Je sais que ce n'est pas toujours facile pour toi en ce moment, mais je suis sûr que tu feras une excellente thèse alors accroche toi car j'ai envie de venir picoler à ton pot d'après thèse !

Je vais ensuite remercier mes autres camarades du bureau du fond en commençant par la maman du labo: **Dominique**, grâce à toi je sais qu'on peut avoir des cheveux blancs et avoir la classe, ça me donne beaucoup d'espoir ! Merci pour ton aide technique, pour tes blagues vaseuses et pour toutes les histoires (et les dossiers) que tu as pu nous raconter dans le bureau du fond. Profite bien de ta retraite ☺. **Alexandre et Mathou**, même si ce fut bref, c'était un plaisir de travailler et de déconner avec vous autour d'un bon café Starbuck ! **Alexandre**, j'espère que tu sauras faire bonne usage de toutes les connaissances que je t'ai inculqué sur la 2D-DIGE !

Bien que le bureau du fond représente la crème de la crème du JParc, certaines personnes appartenant à des bureaux un peu moins *hype* méritent aussi des remerciements. Ainsi, je remercie **Manon** et **Mélissa** pour leur bonne humeur, même si on aurait aimé vous voir plus souvent aux afterwork ☺. Bon courage pour la suite de votre thèse (surtout avec **Bruno**) ! Je remercie également nos post-docs, **Claudia, Emilie et Claire S.** pour leur sympathie et leurs conseils. **Claudia**, tu auras plus d'une fois illuminé le couloir du labo avec ton sourire toujours ultra *bright* ! **Claire S.**, j'espère que tu auras une vision moins pessimiste de la vie un jour :-p. Enfin, merci à **Julien** pour son accent chantant et ses anticorps anti-Tau « passe-partout » !

Merci également à mes petits stagiaires, **Camille MACHALA**, **Florent SAUVE** et **Hubert DEBREYNE** pour leurs jolies Western blots (moins pour les moches :p), ça a été un plaisir de vous encadrer. Bon courage à toi Camille pour les épreuves qui t'attendent !

I would also like to thank **Lucrezia** for teaching me a lot of Italian insults ! I hope you enjoyed learning 2D-DIGE with me although I know you were often close to the nervous breakdown (but you are used to with **David** :-p).

Afin d'éviter tout incident diplomatique ou de voir mes affaires embrasser le trottoir je vais également remercier **Caroline**. Merci de me soutenir dans cette période particulière qu'est la fin de thèse, je sais que je ne suis pas toujours de bonne humeur et que je gueule parfois comme un putois pour pas grand-chose mais bon... au final t'es pire que moi donc ça va je ne culpabilise pas trop ☺ (**Pee-Wee** acquiesce au moment où j'écris ces mots). Merci également de me pousser, sans toi j'aurais probablement raté ma vie à coup sûr (toi seule comprendras). Plus sérieusement, c'est avec un vice non dissimulé que j'avoue m'être réjoui de l'échec des précédents candidats de **Nicolas** au concours. Grâce à cela j'ai eu l'occasion de rencontrer une personne extraordinaire ☺. Je sais que tu doutes beaucoup de toi et que tu remets en question souvent (trop souvent ?), et rien que pour ça je suis certain que tu feras une excellente thèse, une excellente chercheuse et probablement un chef tyrannique ! De plus, quand je vois avec quelle ferveur tu me contes tes expériences sur VCP, j'ai l'intime conviction que tu n'abandonneras pas la science de sitôt et que je n'ai pas fini d'entendre parler d'autophagie... Je terminerais en te disant de t'accrocher, de garder confiance en toi et de te dépêcher de terminer ta thèse ;-).

Je vais également remercier l'ensemble des ITA du laboratoire : **Sabiha**, **Raph**, **Séverine** vous êtes les anges gardiens (et les bourreaux) du laboratoire. Merci de prendre soin de nous, de nous lyncher quand on fait un peu trop les cons, et de faire en sorte qu'on ne termine pas dissout dans l'acide ! Même si moi je mets toujours ma blouse ! Félicitation encore à toi **Sabiha** pour ton poste, tu le mérites amplement au vue de tous ce que tu fais au laboratoire ! **Hélène**, tu as été la première à me former quand je suis arrivé en M1. Tu m'as ensuite appris la 2D-DIGE, toujours dans la bonne humeur et les blagues pourries, pour ça je te remercie ! **Sebastien C.** merci pour les moments de haute gastronomie au restaurant universitaire avec toi et Alban! Merci aussi à toi **Sébastien D.** pour tes blagues bien lourdes et tes poils de torse, un jour je ferais peut être un iron man avec toi... ou pas.

Enfin, je vais remercier l'ensemble des personnes de l'équipe et des personnes externes avec lesquelles nous travaillons (ou avons travaillé) quotidiennement, d'ici ou ailleurs... **Xabi, Delphine, Cedrick, Nadège, Meryem, Julien, Vincent H, Espérance, Lucie, Andrea, Davina, Marie B., Charlotte, Marie A.**

Je tiens à terminer en remerciant le ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur ainsi que l'association France Alzheimer pour avoir financé ma thèse.

Résumé

Le terme dégénérescence lobaire frontotemporale ou FTLD définit un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives caractérisé par des troubles du langage, du comportement et/ou moteurs qui résultent principalement d'une dégénérescence du cortex frontal et temporal. Cette hétérogénéité tant au niveau clinique, génétique que neuropathologique rend cette pathologie très complexe et il existe aujourd'hui un véritable problème de diagnostic différentiel des FTLD.

Le diagnostic final des FTLD repose ainsi sur l'examen neuropathologique, la nature des lésions observées et leurs constituants moléculaires. La caractérisation de ces lésions a permis d'établir une classification des FTLD qui ne cesse d'évoluer avec la découverte de nouveaux acteurs moléculaires. À l'instar de nombreuses maladies neurodégénératives, les FTLD sont caractérisées par la présence de protéines agrégées dans les régions cérébrales affectées. Cependant, contrairement à la maladie d'Alzheimer (MA), ces agrégats ne sont pas toujours constitués des mêmes protéines. Ainsi, approximativement 40% des cas de FTLD présentent des agrégats composés de protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées, et forment le groupe FTLD-Tau. Lorsqu'aucune pathologie Tau n'est détectée, les patients présentent généralement des inclusions neuronales cytoplasmiques ou intranucléaires immunoréactives pour la protéine TDP-43 (*transactive response DNA binding protein 43*), et constituent la sous-classe FTLD-TDP. Plus rarement, la protéine FUS (*Fused in Sarcoma*, FTLD-FUS) ou des protéines liées au système ubiquitine protéasome peuvent également s'agréger (FTLD-UPS).

La génétique représente également une composante majeure des FTLD avec 10 à 15% des cas correspondant à des formes héréditaires dominantes. Les premières mutations furent découvertes sur le gène *MAPT*. Le gène de la progranuline (*GRN*) fut ensuite identifié comme fréquemment associé aux FTLD. Plus récemment, une répétition anormale d'héxanucléotides GGGGCC au sein du gène *C9ORF72* (*chromosome 9 open reading frame 72*) a été montrée comme étant responsable d'un grand nombre de cas familiaux de FTLD. De manière moins fréquente, d'autres gènes tels que *VCP* (*valosin containing protein*) ou *CHMP2B* (*charged multivesicular body protein 2B*) peuvent aussi être associés à des cas familiaux de FTLD.

Des années avant la découverte des principaux acteurs moléculaires des FTLD, des études ont décrit une perte partielle ou totale des protéines Tau physiologiques dans le tissu cérébral. À l'origine, ce phénomène fut observé dans un groupe de démences appelées DLDH pour démences sans signe histopathologique distinctif (appelé par la suite FTLD-ni pour *no inclusion*). En 2006, la

majorité de ces cas a été reclassée en tant que FTLD-U (présence de lésions immunoréactives pour l'ubiquitine). En revanche, aucune étude ne s'est intéressée à cette perte de Tau depuis celle de Zhukareva et collègues en 2003. Au regard des récentes avancées sur la compréhension de la base moléculaire et génétique des FTLD, la pertinence de cette perte de Tau restait ainsi encore à déterminer.

Dans ce contexte, ce travail de recherche a pour principal objectif d'étudier l'expression des protéines Tau au sein du tissu cérébral d'individus sains ou atteints de différents troubles neurodégénératifs (MA, FTLD-Tau, FTLD-TDP-*GRN*, FTLD-TDP-*C9ORF72*, FTLD-TDP et FTLD-FUS sporadiques) en utilisant la technique d'immunoempreinte. De manière remarquable, nous avons mis en évidence une réduction significative de Tau, et ce, spécifiquement chez les patients FTLD-TDP-*GRN*. Ainsi, nos résultats démontrent que ces cas, appelés FTLD-TDP-*GRN*_{lr} (pour *low Tau protein level*), caractérisés par une altération synaptique et une astroglie très importante, pourraient constituer un groupe distinct dans la classification des FTLD. Nous avons également réalisé une analyse protéomique différentielle entre les sous-classes de FTLD dans le but d'identifier des marqueurs ou des voies métaboliques communes. Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec le laboratoire Inserm UMR_S1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière à Paris (coordinateur : Isabelle LE BER) qui a réalisé en parallèle une analyse transcriptomique (RNAseq) sur les mêmes patients inclus dans l'étude de protéomique.

Abstract

FTLD is a clinical syndrome mainly characterized by progressive deterioration in behavior, personality and/or language resulting from progressive frontal and temporal degeneration. In addition, movement disorder can also be frequently observed. Given this phenotype variability, FTLN clinical diagnosis remains difficult and uneasy to establish with certainty.

The final diagnosis relies on neuropathological examination of the brain, the characteristics of these brain lesions and their molecular basis. Indeed, as many neurodegenerative diseases, FTLN are characterized by the presence of protein aggregates in the affected brain regions. However, in contrast to the well-characterized nature of protein inclusions in Alzheimer's disease (AD), proteinaceous aggregates in FTLN can be composed of different proteins. Thus, approximately 40% of FTLN cases display aggregates made of abnormally and hyperphosphorylated Tau proteins and constitute the FTLN-Tau subclass. However, most of FTLN brains are negative for Tau inclusions and exhibit neuronal cytoplasmic and/or nuclear inclusions immunoreactive for transactive response DNA binding protein 43 (TDP-43) and constitute the FTLN-TDP subclass). To a lesser extent, another protein called FUS (Fused in Sarcoma protein) is found in aggregates that are Tau and TDP-43 negative. This subclass is thus named FTLN-FUS. Finally, inclusions negative for Tau, TDP-43 or FUS are observed in rare cases of FTLN and associated with ubiquitin-proteasome system related proteins (FTLN-UPS).

Gene mutations also play an important role in FTLN with 30 to 50% of patients reporting a positive family history of FTD and 10 to 15% of patients corresponding to dominantly inherited form. Firstly described are the *MAPT* mutations. Mutations in the progranulin gene *GRN* were then found to be the most frequent mutations associated with FTLN. More recently, two studies demonstrated that expanded hexanucleotide GGGGCC repeats in a noncoding region of the chromosome 9 open reading frame 72 (*C9ORF72*) gene was responsible for a large proportion of FTLN. Less frequently mutations in the valosin containing protein (VCP) gene or charged multivesicular body protein 2B (*CHMP2B*) gene are also found associated with FTLN.

Prior to the discovery of the main molecular actors of FTLN, studies described a partial or total loss of soluble or physiological Tau protein expression in both grey and white matter. This loss of Tau was originally found in a subset of dementia called DLN for Dementia Lacking Distinctive Histopathology (renamed later FTLN-ni for FTLN with no inclusion). In 2006, most of these cases were reclassified as FTLN-U (presenting with ubiquitin positive inclusions). However, additional

investigation with specific regards to this loss of Tau expression has not been reported since Zhukareva et al. in 2003. With the progress in genetics and neuropathology of FTLD, the question of whether this reduction of Tau expression is seldom remains ill-defined.

This work takes place in this context whose primary goal was to investigate human brain Tau protein expression in Control, AD, FTLD-Tau, FTLD-TDP-*GRN*, FTLD-TDP-*C9ORF72*, sporadic FTLD-TDP and sporadic FTLD-FUS brains using western blot analysis. Remarkably, we demonstrated a huge reduction of all six human brain Tau isoforms only in a subset of FTLD-TDP brains with mutation on the *GRN* gene. Thus, our data clearly suggest that these specific cases, referred to as FTLD-TDP-*GRN* τ (for low levels of Tau protein), could be part of the current classification as a distinct entity with more severe synaptic dysfunction and astrogliosis. Beside this, we also performed a comparative proteomic study between the different FTLD sub-classes in order to find common physiopathological mechanisms.

Avant-propos

La démence (du latin *demens* qui signifie folie) est un syndrome dans lequel il est observé une altération de la fonction cognitive (mémoire, raisonnement, orientation, langage, compréhension, calcul, capacité d'apprentissage, langage ou jugement) qui conduit à une perte d'autonomie et l'incapacité d'assumer les activités de la vie quotidienne (Organisation Mondiale de la Santé, 2016). Bien que ces symptômes puissent apparaître lors du vieillissement normal, ces derniers sont plus précoces et plus importants chez les individus déments. De plus, ces dysfonctionnements cognitifs sont souvent associés à une détérioration du contrôle émotionnel, du comportement social ou de la motivation. Les démences résultent principalement d'atteintes irréversibles du système nerveux central, incluant les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA) ou bien les accidents vasculaires cérébraux. Néanmoins, des causes diverses peuvent également favoriser l'apparition d'une démence, tel que des carences en vitamine ou des problèmes thyroïdiens.

Le traitement des démences dépend de leur origine. Dans la plupart des démences évolutives, comme la MA, il n'existe actuellement pas de traitement permettant de soigner ou de ralentir la maladie. Néanmoins, des médicaments permettent de traiter certains symptômes et les approches non médicamenteuses, telles que la musique ou les arts plastiques, se sont révélées efficaces (pour revue (Hulme et al., 2009)) . Par ailleurs, il est possible de d'améliorer les conditions des patients par différents moyens: (i) établir un diagnostic précoce afin d'accélérer la prise en charge, (ii) favoriser les activités physiques et cognitives, (iii) détecter les symptômes des maladies concomitantes (troubles moteur, psychiatriques), (iv) et favoriser la communication entre les cliniciens et les aidants afin d'optimiser les soins apportés (OMS, 2016).

La prévention joue aussi un rôle essentiel. En effet, des études ont montré que lutter contre les facteurs de risque cardio-vasculaire, comme l'obésité, l'hypertension ou le cholestérol, diminue les risques de développer une démence (Leboucher et al., 2013). En outre, certaines pratiques individuelles comme l'activité physique régulière ainsi que l'entretien de sa réserve cognitive (développement des réseaux neuronaux) semblent être protectrices (Belarbi et al., 2011).

En dehors des conséquences physiques, psychologiques et sociales des démences, celles-ci représentent également un enjeu économique important pour les patients, les proches et la société. Ainsi, l'OMS estime à 47,5 millions le nombre de personnes affectés par une démence dans le monde, et indique que plus de la moitié (58%) vivent dans un pays à revenu faible ou intermédiaire.

Le nombre de personnes atteintes de démence augmente d'environ 7,7 millions chaque année et devrait atteindre 75,6 millions en 2030 et 135,5 millions en 2050. Au total, la prise en charge de ces patients (frais médicaux, dépenses sociales...) a représenté en 2010 un coût estimé à 605 milliards de dollars dans le monde, soit un montant équivalent à 1% du produit intérieur brut (PIB) mondial (OMS, 2015). Ainsi, en tenant compte de l'évolution du nombre de cas et du fait que seul un patient sur deux est actuellement pris en charge et/ou diagnostiqué, le coût sociétal des démences risque de devenir astronomique.

La démence la plus fréquente est la maladie d'Alzheimer. Elle affecte les personnes âgées de plus de 65 ans, et est considérée comme une démence sénile. En France, on estime le nombre de personnes atteintes à 600 000 cas (www.francealzheimer.org). Après la MA, se positionnent les dégénérescences lobaires frontotemporales (ou FTLD) qui représentent la deuxième cause de démence présénile chez les individus âgés de moins de 65 ans. Les FTLD représentent un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives très complexes d'un point de vue, clinique, génétique et neuropathologique. Dans cette introduction, nous décortiquerons ainsi la classification actuelle des FTLD et verrons les principaux mécanismes physiopathologiques impliqués.

Sommaire

Liste des figures	19
Liste des tableaux	22
Liste des abréviations	23
Introduction	25
Chapitre 1 : le concept de dégénérescence lobaire frontotemporale	27
I. Généralités.....	27
II. Evolution du concept de FTLT depuis 1892.....	28
Chapitre 2 : Aspects cliniques des FTLT	32
I. Le variant comportemental, bvFTD.....	32
II. L'aphasie primaire progressive, PPA.....	33
A. Le variant sémantique, svPPA.....	34
B. L'aphasie progressive non fluente, nfvPPA.....	35
C. L'aphasie logopénique, lvPPA.....	36
III. Les troubles moteurs associés.....	36
A. Le syndrome corticobasal.....	36
B. La paralysie supranucléaire progressive.....	37
C. Syndrome parkinsonien lié au chromosome 17.....	37
D. Les maladies du motoneurone associées aux FTLT, focus sur l'ALS.....	37
IV. Diagnostic et traitements.....	39
A. Diagnostic.....	39
1) Examen neuropsychologique.....	39
2) Imagerie médicale.....	40
3) Autres tests.....	40
B. Traitements actuels.....	41
Chapitre 3 : Les FTLT-Tau	43
I. Structure et fonctions de la protéine Tau.....	43
A. Expression et structure de Tau.....	43
1) Du gène à la protéine.....	43
2) Structure et domaines de la protéine Tau.....	45
B. Fonctions physiologiques.....	46
1) Fonctions axonales.....	46
2) Fonctions nucléaires.....	48
3) Fonctions synaptiques.....	48
4) Autres fonctions.....	49
II. Modifications post-traductionnelles.....	49
A. Phosphorylation.....	50
B. Autres modifications.....	50
III. Tau et les FTLT-Tau.....	51
A. Physiopathologie de la protéine Tau.....	51
1) Hyperphosphorylation et perte de fonction de Tau.....	51
2) Agrégation et gain de fonction toxique.....	53
3) Propagation de la pathologie Tau, l'hypothèse prion.....	54
B. Classification biochimique des FTLT-Tau.....	55
1) 3R FTLT-Tau : Maladie de Pick.....	56

2) 4R FTLD-Tau	56
a) Paralyse supranucléaire progressive	56
b) Dégénérescence corticobasale	57
c) Tauopathie gliale globulaire	57
d) Maladie à grains argyrophiles	57
IV. Les cas héréditaires de FTLD-Tau, implication des mutations sur le gène MAPT	58
Chapitre 4 : Les FTLD-TDP	60
I. Biologie de TDP-43	60
A. Structure de TDP-43	60
B. Fonctions physiologiques de TDP-43	61
1) Fonctions nucléaires	61
a) Modulation de l'épissage des pré-ARNm par TDP-43	61
b) Régulation des micro-ARN (miRNA)	62
c) Régulation de l'expression des longs ARN non codants	64
2) Fonctions cytosoliques	64
a) Stabilisation des ARNm	64
b) Transport des ARNm	65
c) Régulation de la traduction des ARNm	65
II. Physiopathologie de TDP-43	66
A. Les différents sous-types histopathologiques de FTLD-TDP	67
1) FTLD-TDP Type A	67
2) FTLD-TDP Type B	67
3) FTLD-TDP Type C	67
4) FTLD-TDP Type D	67
B. Physiopathologie de TDP-43	68
1) Modifications post-traductionnelles	68
a) Phosphorylation	69
b) Ubiquitylation	70
c) Troncation	71
2) Délocalisation de TDP-43	72
3) Agrégation	73
4) TDP-43, une protéine prion ?	73
Chapitre 5 : Génétique des FTLD-TDP	75
I. GRN	75
A. Structure et expression de la progranuline	75
1) Structure	75
2) Expression dans le SNC	76
3) Modulation de l'expression par TMEM106B	76
B. Fonctions biologiques	77
1) Fonctions neuronales	77
a) Croissance des prolongements neuronaux	77
b) Plasticité synaptique	78
c) Autres fonctions	78
2) Fonctions microgliales	79
C. Rôle de la progranuline dans la l'agrégation de TDP-43	80
D. Neuropathologie et signes cliniques associés	81
II. C9ORF72	82
A. Généralités	82
B. Mécanismes physiopathologiques liés aux répétitions GGGGCC	83
C. Présentation clinique et neuropathologie	84
III. Autres gènes impliqués	85

A. TARDBP.....	86
B. VCP.....	86
C. Autres gènes.....	87

Chapitre 6 : Sous-classes minoritaires de FTLD et syndromes apparentés..... 88

I. FTLD-FET.....	88
A. Les sous-types de FTLD-FET.....	90
1) aFTLD-U.....	90
2) NIFID.....	91
3) BIBD.....	92
B. Influence de la génétique dans FTLD-FET.....	93
1) FTLD-UPS.....	93
2) Autres pathologies de type FTLD.....	94

Objectifs du projet de recherche..... 95

Matériels et Méthodes..... 99

Matériels..... 101

I. Tissu cérébral humain.....	101
-------------------------------	-----

Méthodes..... 103

I. Extraction des protéines.....	103
II. Immunoempreinte.....	103
A. Electrophorèse monodimensionnelle.....	103
B. Transfert des protéines.....	103
C. Immunomarquage.....	104
III. 2D-DIGE.....	105
A. Préparation des échantillons pour la 2D-DIGE.....	106
B. Marquage des échantillons par les cyanines (CyDye).....	107
C. 1 ^{ère} dimension : Isoélectrofocalisation (IEF).....	107
D. 2 ^e dimension : SDS-PAGE.....	107
E. Analyse des images.....	108
F. Gels préparatifs pour l'identification des spots dérégulés.....	108
G. Digestion trypsique, spectrométrie de masse et identification des protéines.....	108
IV. Extraction des ARN et analyse quantitative par qRT-PCR (quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction).....	109
V. Analyses statistiques.....	109

Partie I : Réduction des protéines Tau solubles dans les cas de FTLD-TDP portant des mutations

sur le gène de la progranuline..... 110

Résultats..... 112

I. Etude de la phosphorylation des protéines Tau.....	112
II. Etude de l'expression des protéines Tau solubles.....	113
III. Etude des mécanismes potentiellement impliqués dans la réduction des protéines Tau.....	115
A. Analyse de l'expression du gène <i>MAPT</i>	115
B. Etude de la présence d'exons cryptiques au sein des transcrits de Tau.....	116

C.	Etude des facteurs impliqués dans la dégradation de Tau	117
D.	Contrôle de la qualité des échantillons de tissus cérébraux	118
IV.	Comparaison des protéomes entre les cas FTLD-TDP τ et FTLD-TDP-GRN τ	119
V.	Validation des résultats obtenus en protéomique par immunoempreinte	122

Discussion-Conclusion..... 124

I.	Pertinence de la réduction des protéines Tau dans les FTLD	124
II.	Comment expliquer cette réduction des protéines Tau ?	124
A.	Une dérégulation transcriptionnelle peut-elle expliquer cette réduction ?	124
B.	Quel lien avec TDP-43 ?	125
C.	Et la Progranuline ?	126
III.	Quelles sont les conséquences de la réduction de l'expression Tau au regard de ses multiples fonctions ?	127

Perspectives..... 130

I.	Confirmer le lien entre la progranuline et la diminution de l'expression des protéines Tau	130
II.	Etudier les autres mécanismes pouvant moduler le niveau de protéines Tau dans le tissu cérébral	131
III.	Déterminer le lien entre Tau, TDP-43 et la progranuline dans ce contexte physiopathologique particulier	132
IV.	Approfondir l'étude protéomique et valider les marqueurs identifiés	133

Partie II : Analyse protéomique comparative des différentes sous-classes de FTLD..... 134

Résultats..... 136

I.	FTLD-TDP-GRN vs Témoin.....	137
II.	FTLD-TDP Sporadique vs Témoin	138
III.	FTLD-Tau-MAPT vs Témoin	141
IV.	Aucun changement significatif pour les groupes FTLD-TDP-C9RORF72 et FTLD-FUS	142
V.	Tableau récapitulatif	143

Discussion-Conclusion..... 144

Perspectives..... 145

Bibliographie..... 146

Annexes 175

Exemples de tests neuropsychologiques 177

I.	MMSE	177
II.	BREF	178

Cartes des spots dont dérégulés lors de l'analyse 2D-DIGE des différents groupes de FTLD..... 179

Curriculum Vitae 182

Publication principale..... 186

Autre publication 208

Liste des figures

- Figure 1** : Aspects macroscopiques de la dégénérescence lobaire frontotemporale.
- Figure 2** : Mise en évidence des corps de Pick dans les neurones par Alois Alzheimer.
- Figure 3** : Dates majeures de l'évolution du concept de FTLD.
- Figure 4** : Schéma représentant la classification moléculaire des FTLD ainsi que les principaux gènes et entités cliniques associés.
- Figure 5** : Atrophie et hypométabolisme du glucose dans le lobe frontal de patients FTLD. F
- Figure 6** : Représentation schématique du gène *MAPT*, de son pré-ARNm ainsi que des 6 isoformes présentes dans le cerveau humain adulte. L
- Figure 7** : Structure primaire de l'isoforme de Tau la plus longue (isoforme 2N4R).
- Figure 8** : Représentation schématique de Tau interagissant avec un microtubule et du transport axonal au sein du neurone.
- Figure 9** : Régulation de la dynamique microtubulaire selon l'état de phosphorylation de la protéine Tau.
- Figure 10** : Tau en conditions physiologiques ou pathologiques.
- Figure 11** : Classification biochimique des FTLD-Tau.
- Figure 12** : Sous-classes neuropathologiques de FTLD-Tau.
- Figure 13** : Représentation de la plupart des mutations affectant le gène *MAPT* dans les FTDP-17.
- Figure 14** : Représentation schématique des différents domaines protéiques de TDP-43.
- Figure 15** : Représentation schématique des principales fonctions de TDP-43 au sein des différents compartiments neuronaux.
- Figure 16** : Caractéristiques neuropathologiques des différents sous-types de FTLD-TDP.
- Figure 17** : Stabilité et renouvellement de TDP-43 en fonction des modifications post-traductionnelles.
- Figure 18** : Progression séquentielle de la pathologie TDP-43 dans les FTLD-TDP.
- Figure 19** : Représentation schématique du gène de la progranuline et de la majorité des mutations pathologiques associées au FTLD-TDP.
- Figure 20** : Représentation schématique du gène *GRN* et de sa protéine.
- Figure 21** : Représentation schématique des fonctions potentielles de la progranuline au niveau du système nerveux central.
- Figure 22** : Structure du gène *C9ORF72* et localisation des répétitions GGGGCC(n).

Figure 23 : Mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans les cas de FTLD *C9ORF72*.

Figure 24 : Les foci d'ARN intranucléaires et les agrégats de dipeptides répétés cytoplasmiques sont caractéristiques des cas de FTLD associés à une expansion (GGGGCC)_n du gène *C9ORF72*.

Figure 25 : Représentation de TDP-43 et d'une partie des mutations associées aux cas familiaux de FTLD et d'ALS.

Figure 26 : Mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans les FTLD-FET et ALS-FUS. Les protéines de la famille FET, FUS (bleue), EWS (verte), et TAF15 (rouge), disposent toutes d'un NLS (représenté ici par un triangle) qui est reconnu par Trn1 et permet leur transport dans le noyau.

Figure 27 : Aspects microscopiques des FTLD-FET.

Figure 28 : Représentation schématique de la technique de 2D-DIGE.

Figure 29 : Représentation schématique de la protéine Tau et des épitopes reconnus par les anticorps.

Figure 30 : Absence de protéines Tau phosphorylées dans les cas de FTLD.

Figure 31 : Réduction de la quantité de protéines Tau dans les cas de FTLD-TDP-GRN. (a)

Figure 32 : Conservation de l'expression des ARNm de Tau dans les FTLD-TDP-GRN τ .

Figure 33 : Aucune augmentation de l'inclusion d'exons cryptiques n'est observée au sein des ARNm de Tau chez les patients FTLD-TDP-GRN τ .

Figure 34 : Absence d'augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la dégradation de Tau chez les patients FTLD-TDP-GRN τ

Figure 35 : Mise en évidence de la préservation de plusieurs marqueurs dans les cas de FTLD.

Figure 36 : la réduction des protéines Tau observée dans le tissu cérébral des cas FTLD-TDP-GRN τ ne résulte pas de facteurs externes tels qu'un délai post-mortem plus long, une dégradation accrue des échantillons (évaluée par le RIN), ou une atrophie corticale plus importante.

Figure 37 : Analyse par 2D-DIGE (*two dimensional differential gel electrophoresis*) du cortex frontal chez les cas FTLD-TDP-GRN τ et FTLD-TDP τ .

Figure 38 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins, FTLD-TDP-GRN τ et FTLD-TDP τ par la technique d'immunoempreinte.

Figure 39 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-TDP-GRN par la technique d'immunoempreinte.

Figure 40 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-TDP Sporadiques par la technique d'immunoempreinte.

Figure 41 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-Tau-*MAPT* par la technique d'immunoempreinte.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résumé des principales caractéristiques cliniques des différentes formes d'aphasies primaires progressives.

Tableau 2 : Données démographique et neuropathologique des cas utilisés pour l'étude.

Tableau 3 : liste des anticorps utilisés pendant cette étude.

Tableau 4 : Liste des protéines différentiellement exprimées entre le groupe FTLD-TDP-*GRN* τ et FTLD-TDP τ .

Tableau 5 : Données démographique et neuropathologique des cas utilisés pour l'étude.

Tableau 6 : Liste des protéines différentiellement exprimées entre le groupe FTLD-TDP-*GRN* et Témoin.

Tableau 7 : Liste des protéines différentiellement exprimées entre le groupe FTLD-TDP sporadique et Témoin.

Tableau 8 : Liste des protéines différentiellement exprimées entre le groupe FTLD-Tau-*MAPT* et Témoin.

Tableau 9 : Tableau indiquant les protéines dérégulées ainsi que leur fonction associé pour chaque groupe de FTLD.

Liste des abréviations

- A β** : peptide β amyloïde
- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AGD** : Démence à grains argyrophiles
- ALS** : Sclérose Latérale Amyotrophique
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNm** : ARN messenger
- BIBD** : Maladie à corps d'inclusions basophiles
- C9ORF72** : *Chromosome 9 Open reading frame 72*
- CBD** : Dégénérescence corticobasale
- CHMP2B** : *Charged Human Multivesicular Body Protein 2B*
- CTF** : Fragments carboxy-terminaux
- Cy** : Cyanine
- DLDH** : Démences sans signe histopathologique distinctif
- DN** : Neurites dystrophiques
- DPR** : *Dipeptide Repeat Protein*
- DRP-2** : Dihydropyrimidinase-Related Protein 2
- FET** : *Fused in sarcoma, Ewing's sarcoma, TATA-binding protein-associated factor 15*
- FTDP-17** : Démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17
- FTLD** : Dégénérescence lobaire frontotemporale
- FUS** : *Fused in Sarcoma*
- GFAP** : *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- GRN** : Progranuline
- GS** : Glutamine Synthétase
- HnRNP** : Ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes
- MA** : Maladie d'Alzheimer
- MAP** : Protéine associée aux microtubules
- miRNA** : micro ARN
- MND** : Maladie des motoneurones
- MPT** : modification post-traductionnelle
- MS** : Spectrométrie de masse

Munc-18 : *Syntaxin Binding Protein 1*

NCI : Inclusion cytoplasmique neuronal

NES : Séquence d'exportation nucléaire

NFT : enchevêtrement neurofibrillaire

NIFID : maladie à inclusions de neurofilaments intermédiaires

NI : Inclusion intranucléaire neuronale

NLS : Séquence de localisation nucléaire

NSE : *Neuron Specific Enolase*

PHF : Paire de filaments appariée en hélice

PiD : Maladie de Pick

PPA : Aphasie Progressive Primaire

PSD-95 : *Post-Synaptic Density 95*

PSP : Paralyse Progressive Primaire

RRM : Motif de reconnaissance aux ARN

SNC : Système nerveux central

Tau : *Tubulin-associated unit*

TDP-43/TARDBP : *TransActive Response DNA Binding Protein 43*

UPS : Système Ubiquitine-Protéasome

UTR : Région non-traduite

VCP : *Valosin Containing Protein*

WT : Wild-type, sauvage

INTRODUCTION

Chapitre 1 : le concept de dégénérescence lobaire frontotemporale

I. Généralités

Le terme dégénérescence lobaire frontotemporale ou FTLD définit un groupe hétérogène de maladies neurodégénératives caractérisées par des troubles du langage, du comportement et/ou moteurs qui résultent principalement d'une dégénérescence du cortex frontal et temporal (**Figure 1**) mais pouvant également affecter certains noyaux sous-corticaux. Cette hétérogénéité, qui se caractérise à la fois au niveau clinique, génétique mais aussi neuropathologique rend la compréhension de cette pathologie très complexe. La démence frontotemporale, ou FTD (pour *frontotemporal dementia*), représente quant à elle l'expression clinique des FTLD.

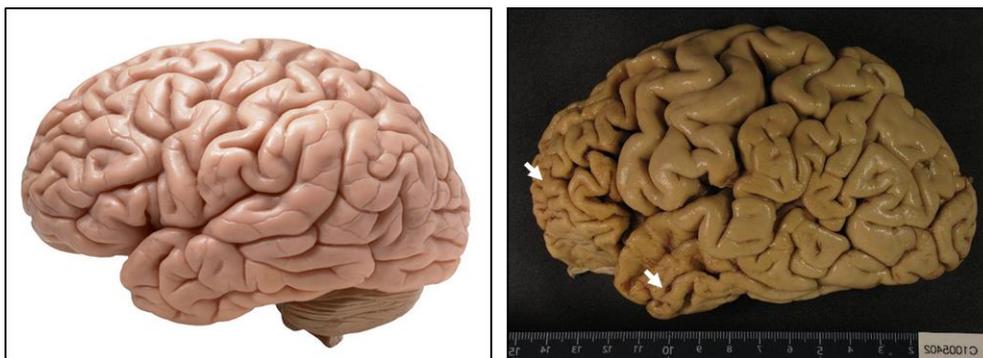


Figure 1 : Aspects macroscopiques de la dégénérescence lobaire frontotemporale. A gauche, le cerveau d'un individu sain. En comparaison, le cerveau d'un patient atteint de FTLD (à droite) présente une atrophie marquée de la région frontale et temporale (flèches blanches, image issue du service d'anatomie pathologique du CHRU de Lille, Pr. Vincent DERAMECOURT).

Les FTLD comptent pour 5 à 15% des démences dans le monde. Après la maladie d'Alzheimer, les FTLD représentent ainsi la deuxième cause de démence présénile (individus âgés de moins de 65 ans). Bien que la pathologie puisse apparaître de façon précoce (21 ans) ou tardive (après 80 ans), la plupart des cas développent les premiers symptômes entre 45 et 64 ans. On recense entre 50 000 et 60 000 cas aux Etats-Unis et environ 6 000 cas en France (Rabinovici et Miller 2010). Concernant la prévalence dans le monde, elle est estimée entre 15 et 22 cas pour 100 000 personnes avec une incidence annuelle située entre 3 et 4 cas pour 100 000 personnes (Onyike et Diehl-Schmid 2013). A la différence de la maladie d'Alzheimer, la distribution entre les hommes et les femmes est équivalente. La survie

moyenne se situe entre 7 et 13 ans après le diagnostic de la maladie (Onyike et Diehl-Schmid 2013). Cependant, l'espérance de vie chute dramatiquement chez les patients présentant des troubles moteurs associés, avec une survie entre 2 et 3 ans après le début des premiers symptômes (Hodges et al., 2003).

II. *Evolution du concept de FTLD depuis 1892*

La terminologie des FTLD est complexe et a évolué constamment depuis la description du premier patient par Arnold Pick, en 1892. A l'époque, Arnold Pick, Professeur en neuropsychiatrie, décrit des troubles du comportement, du langage ainsi que des signes de démence chez un patient âgé de 71 ans (Pick, 1892). A la mort du patient, l'autopsie du cerveau révéla une atrophie marquée du lobe temporal qui se distinguait de celle, plus diffuse, généralement observée chez les patients souffrant de démence sénile. En 1906, après avoir observé d'autres cas similaires, Pick fut confronté à un cas manifestant une désinhibition associée à une atrophie sévère de la région frontale. Ainsi, avec ces différents cas, Pick mis en évidence pour la première fois l'existence d'une atrophie corticale focale spécifique du lobe frontal et/ou temporal. L'analyse histopathologique réalisée par le Dr. Alois Alzheimer permettra de révéler la présence d'inclusions intraneuronales argyrophiles dans le cerveau de ces patients, qui seront par conséquent nommées corps de Pick (Alzheimer, 1911) (**Figure 2**).

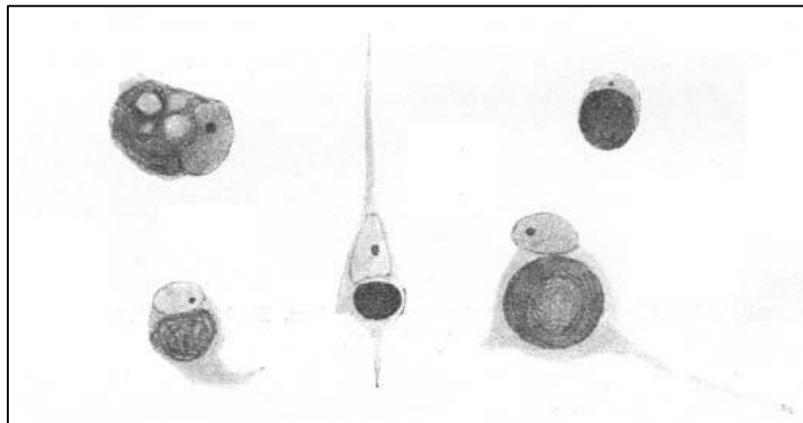


Figure 2 : Mise en évidence des corps de Pick dans les neurones par Alois Alzheimer. Issue de (Alzheimer, 1911) .

Finalement, avec l'augmentation du nombre de patients décrits, ces cas furent regroupés sous une même entité clinico-pathologique appelée Maladie de Pick (PiD, pour *Pick disease*) (Gans, 1925; Onari et Spatz, 1926) (**Figure 3**).

Quelques décennies plus tard, différentes études soulignèrent l'hétérogénéité des cas d'atrophies frontotemporales en indiquant que la maladie de Pick ne représentait que 20% des cas (Escourolle, 1958). D'autres études ont ensuite confirmé cette hétérogénéité en décrivant diverses pathologies associées à une atrophie du cortex frontal et ou/temporal (Brun, 1987; Mann et al., 1993). En parallèle, un ensemble d'altérations situé dans les couches corticales externes, incluant une gliose ou une microvacuolation du neuropile, fut mis en évidence dans un nombre croissant de cas d'atrophies focales. Ces cas, caractérisés par une absence de lésion histopathologique spécifique, telle que les corps de Pick ou la pathologie Alzheimer, donnèrent naissance à un groupe appelé démences sans lésion histopathologique distinctive ou DLDH (pour *dementia lacking distinctive histopathology*) (**Figure 3**).

Principales étapes de l'évolution du concept de FTLD

- ❖ 1892 : Arnold Pick décrit des cas de démence présentant une atrophie corticale localisée, principalement au niveau frontal et temporal
- ❖ 1911 : Les corps de Pick sont mis en évidence par le Dr. Alois Alzheimer en utilisant l'imprégnation argentique
- ❖ 1925 : Introduction de la maladie de Pick (PiD) comme entité clinico-pathologique par Gans
- ❖ 1950-1990 : Reconnaissance de l'hétérogénéité des FTLDs
- ❖ Années '60: Description des syndromes de PSP et CBD
- ❖ 1974 : Différents sous-types pathologiques de PiD sont décrits
- ❖ 1985-1990 : Mise en évidence de l'agrégation de la protéine Tau dans la MA, PiD, PSP et CBD
- ❖ 1990 : Description de cas de FTD sans histopathologie spécifique, appelées DLDH
- ❖ 1991 : Découverte d'inclusions ubiquitine-positives au niveau du cortex extramoteur de patients MND/ALS associés à des troubles cognitifs
- ❖ 1996 : Mise en évidence d'inclusions ubiquitine-positives dans le cortex de patients atteints de DLDH sans troubles moteurs → FTLD-U
- ❖ 1998 : Identification de mutations sur le gène de Tau (*MAPT*) dans les FLTD (FTDP-17)
- ❖ 2006 : Découverte des mutations sur le gène de la progranuline (*GRN*) dans les FTLD
- ❖ 2006 : Identification de la protéine TDP-43 comme constituant majeur des inclusions ubiquitine-positives trouvées dans les FTLD-U et les MND/ALS
- ❖ 2009 : Mise en évidence que la plupart des cas dépourvus de lésions TDP-43 ou Tau présentent des agrégats immunoréactifs pour la protéine FUS (FTLD-FUS)
- ❖ 2011 : Découverte de l'accumulation d'autres protéines de la famille FET (TAF 15 et EWS) dans les FTLD-FUS
- ❖ 2011 : Description de mutations sur le gène *C9ORF72* comme principal gène commun impliqué dans les FTLD et ALS
- ❖ 2013 : Découverte des agrégats de DPR (*dipeptide repeat*) dans les cas de FTLD/ALS liés à une mutation sur le gène *C9ORF72*

Figure 3: Dates majeures de l'évolution du concept de FTLD. ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*; *C9ORF72*, *chromosome 9 open reading frame 72*; CBD, *corticobasal degeneration*; DLDH, *dementia lacking distinctive histopathology*; DPR, *dipeptide repeat*; EWS, *Ewing sarcoma protein*; FTDP-17, *frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*; FTLD, *frontotemporal lobar degeneration*; FUS, *fused in sarcoma*; GRN, *progranuline*; MAPT, *microtubule associated protein Tau*; MND, *motor neuron disease*; PiD, *Pick disease*; PSP, *progressive supranuclear palsy*; TAF 15, *TATA-box binding associated factor 15*; TDP-43, *transactive response DNA binding protein 43*. Adapté de (Rademakers et al., 2012a).

D'un point de vue clinique, ces patients souffraient d'un trouble sévère de la personnalité, appelé aujourd'hui variant comportementale (bvFTD pour *behavioural variant*

of *FTD*). En parallèle, Mesulam décrira lui une aphasie progressive primaire (PPA pour *primary progressive aphasia*) (Mesulam, 1982). Cette PPA fut par la suite divisée en trois syndromes distincts: le variant sémantique (svPPA, pour *semantic variant PPA*), l'aphasie progressive non fluente (nfvPPA, pour *non-fluent variant PPA*), et l'aphasie progressive logopénique (lvPPA, pour *logopenic variant PPA*) (Gorno-Tempini et al., 2011; Mesulam, 2003).

Dans les années 1990, l'avancée des techniques en histologie permit de mettre en évidence des inclusions ubiquitine-positives dans le cortex frontal et temporal de patients atteints de maladie des motoneurones (MND, pour *motor neuron disease*) associée à une démence (Okamoto et al., 1991). Peu de temps après, ces inclusions furent également observées chez des patients DLDH, ce qui conduisit à l'introduction du concept de FTLD avec inclusions ubiquitine-positives ou FTLD-U (Jackson et al., 1996). Cette découverte fut une avancée majeure puisqu'elle révéla que les inclusions ubiquitine-positives étaient caractéristiques de la majorité des cas répertoriés de FTLD. Ainsi, le terme DLDH n'était plus que rarement justifié. Avec l'accroissement du nombre d'études sur les FTLD, les acteurs moléculaires impliqués dans ces maladies furent peu à peu découverts, notamment l'agrégation de différentes isoformes de la protéine Tau dans les cas de PiD, CBD (pour *corticobasal degeneration*) et PSP (pour *progressive supranuclear palsy*) (Buée-Scherrer et al., 1996; Sergeant et al., 1999). De façon intéressante, cette découverte fut suivie par l'identification du gène *MAPT* (pour *Microtubule Associated Protein Tau*) comme responsable d'une part significative des cas héréditaires de FTLD (Hutton et al., 1998). En 2006, c'est au tour de la protéine TDP-43 (pour *transactive response DNA binding protein 43*) d'être identifiée comme le constituant majeur des lésions ubiquitine-positives dans la majorité des cas de FTLD-U et de MND (FTLD-TDP) (Neumann et al., 2006). Ces données confirmèrent ainsi le lien entre les FTLD et les MND, incluant la sclérose latérale amyotrophique (ALS). La même année, deux équipes mirent en évidence que des mutations sur le gène de la progranuline (*GRN*) étaient fréquemment retrouvées chez les patients FTLD-TDP (Baker et al., 2006a; Cruts et al., 2006). D'autres gènes, plus rarement impliqués, furent également identifiés: *VCP* (*Valosin Containing Protein*), également associé à la maladie de Paget et à la myopathie à corps d'inclusion; *CHMP2B* (*Charged Multivesicular Protein 2B*) dans des cas de FTLD liée au chromosome 3 (FTD-3); *TARDBP* (pour *Transactive Response DNA Binding Protein*); et *FUS* (pour *Fused in Sarcoma*), principalement dans les cas de MND/ALS. Finalement, c'est en 2011 que le principal gène commun aux FTLD et

MND/ALS fut identifié avec la découverte d'une répétition d'héxanucléotides GGGGCC dans une région non codante du gène *C9ORF72* (pour *chromosome 9 open reading frame 72*) (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011).

Avec l'évolution des connaissances sur les FTLD, définir une classification qui prend en compte à la fois les critères cliniques et neuropathologiques est rapidement devenu nécessaire. Ainsi, plusieurs conférences internationales furent tenues à partir de 1986 et aboutirent à un consensus pour le diagnostic des FTLD (Brun et al., 1994; Mackenzie et al., 2010; Neary et al., 1998). Aujourd'hui, ces classifications, bien qu'en constante évolution, sont largement acceptées et utilisées au sein de la communauté scientifique et médicale, et permettent de définir avec plus de fiabilité le diagnostic de FTLD (**Figure 4**).

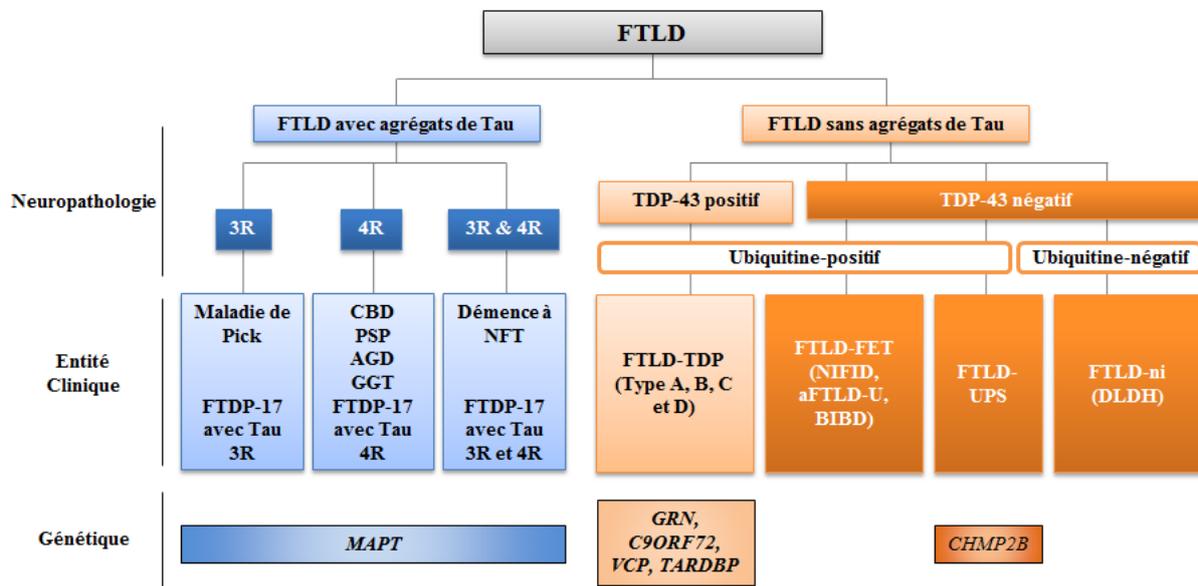


Figure 4: Schéma représentant la classification moléculaire des FTLD ainsi que les principaux gènes et entités cliniques associés. 3R, 3 repeat; 4R, 4 repeat; aFTLD-U, atypical FTLD with ubiquitin-positive inclusions; AGD, argyrophilic grain disease; BIBD, basophilic inclusion body disease; CBD, corticobasal degeneration; DLDH, dementia lacking distinctive histopathology; FET, fused in sarcoma, Ewing's sarcoma, TATA-binding protein-associated factor 15; GGT, globular glial tauopathy; NFT, neurofibrillary tangle; NIFID, neuronal intermediate filament inclusion disease; PiD, Pick's disease; PSP, progressive supranuclear palsy; TDP, transactive response DNA binding protein; UPS, ubiquitin proteasome system. Adaptée de (Lashley et al., 2015).

Chapitre 2 : Aspects cliniques des FTLD

Dans cette, partie nous décrirons les principales caractéristiques cliniques du variant comportemental et des différentes formes d'aphasies primaires progressives. Pour cela, nous nous baserons sur les critères de Lund-Manchester (Brun et al., 1994; Neary et al., 1998) qui ont récemment été revus (Gorno-Tempini et al., 2011; Rascovsky et al., 2011). De plus, nous passerons en revue les principaux troubles moteurs pouvant être associés aux FTLD.

I. *Le variant comportemental, bvFTD*

Les troubles comportementaux observés chez les patients atteints de bvFTD se manifestent par une détérioration du comportement social, de la personnalité et de la cognition causée par un dysfonctionnement des fonctions exécutives (inhibition, attention, planification...). Bien que certains patients atteints de PPA ou de syndromes moteurs (PSP/CBD) puissent présenter des troubles similaires, ces derniers ne sont pas prédominants au premier diagnostic. Au niveau macroscopique, l'imagerie par résonance magnétique volumétrique (IRM) permet de mettre en évidence une atrophie des lobes frontal et temporal, plus particulièrement au niveau du cortex cingulaire antérieur, du cortex insulaire antérieur et du thalamus (Schroeter et al., 2008). De plus, cette atrophie présente une asymétrie avec une atteinte majoritaire de l'hémisphère droit.

Les critères diagnostiques du variant bvFTD ont été récemment revus afin de déterminer de manière précise les principaux changements comportementaux observés dans ce sous-type clinique (Rascovsky et al., 2011). Ainsi, selon ces critères, le diagnostic de bvFTD est possible si les patients présentent au moins 3 des 6 critères cliniques suivants: 5 critères comportementaux (désinhibition, apathie, absence d'empathie ou de sympathie, comportement rituel ou stéréotypé et hyperoralité) et 1 critère cognitif (altération des fonctions exécutives). Cependant, d'autres signes cliniques qui ne sont pas pris en compte dans ces critères de 2011 peuvent être aussi être rencontrés. Parmi eux, est retrouvée une altération de la cognition sociale avec une réduction de la capacité à de comprendre le point de vue ou l'état émotionnel d'un autre individu (Kumfor et Piguet 2012). Cela s'accompagne notamment par une difficulté à reconnaître les différentes émotions et donc à les exprimer, conduisant à ce qui est appelé un émoussement affectif (Neary et al., 1998). Enfin, un faible pourcentage de cas manifeste des hallucinations et des délires.

La complexité et la diversité des signes cliniques observés chez les patients atteints de bvFTD conduisent fréquemment à un mauvais diagnostic. Ainsi, pour plus de 50% des cas de bvFTD, une maladie d'ordre psychiatrique (dépression, schizophrénie ou trouble bipolaire) est émise comme premier diagnostic (Woolley et al., 2011). De plus, bien que la mémoire soit relativement bien conservée au début de la maladie, les patients affichent souvent des déficits de la mémoire verbale et visuelle durant l'examen neuropsychologique. Cela s'explique à la fois par le manque d'efficacité lors des tests, conséquence directe des troubles exécutifs, mais également par l'apparition d'une sclérose de l'hippocampe chez les cas les plus âgés (Baborie et al., 2011). Ainsi, ces facteurs confondants rendent le diagnostic complexe pour les cliniciens, et ce, malgré les derniers consensus établis.

II. *L'aphasie primaire progressive, PPA*

La caractéristique majeure de la PPA est l'apparition d'un déclin progressif et insidieux du langage, qu'il s'agisse de la capacité à produire un discours, à nommer les objets ou encore à comprendre la signification de certains mots (Gorno-Tempini et al., 2011). À l'inverse de la bvFTD, les troubles comportementaux, bien qu'ils puissent se manifester rapidement, ne seront pas prédominants tout au long de l'évolution de la maladie (Mesulam, 1982, 2003). De plus, contrairement à la bvFTD, l'atrophie touche davantage l'hémisphère gauche.

Afin d'établir le diagnostic de PPA, trois critères d'inclusion sont nécessaires: (1) des troubles du langage, (2) ces derniers constituant la principale cause de dégradation du mode de vie et (3) une aphasie prédominante au début de la maladie. En outre, aucune des caractéristiques suivantes ne doit être présente: (i) l'ensemble des déficits est plutôt dû à d'autres désordres médicaux (accident vasculaire cérébral, tumeur), (ii) la détérioration des fonctions cognitives peut s'expliquer par un trouble psychiatrique, (iii) il existe des altérations importantes de la mémoire épisodique et visuelle et (iv) des troubles comportementaux se manifestent de façon marquée (Gorno-Tempini et al., 2011). Si ces critères sont respectés, un examen plus précis permettra de définir le sous-type de PPA (svPPA, nfvPPA ou lvPPA) qui disposent chacun de leurs critères diagnostiques spécifiques (Gorno-Tempini et al., 2011) (**Tableau 1**). En permettant de localiser avec précision certaines régions cérébrales atrophiées, l'imagerie médicale est également un outil précieux pour discriminer les sous-types de PPA.

Caractéristiques cliniques	svPPA	nfvPPA	lvPPA
<u>Langage spontané</u> (fluidité, erreurs, grammaire, prosodie)	Fluide, bavard et circonlocutoire, erreurs sémantiques, grammaire et prosodie intacte	Lent et hésitant, laborieux, erreurs phonétiques, parfois agrammaticale, aprosodie	Hésitant, cherche ses mots (pauses) et perd le fil de la phrase. Grammaire et prosodie intacte
<u>Dénomination</u>	Anomie sévère et paraphasies sémantiques	Anomie modérée et erreurs phonétiques, paraphasies phonémiques	Anomie modérée avec paraphasies phonémiques occasionnels
<u>Compréhension des mots</u>	Faible	Intacte puis altération progressive	Altérée
<u>Compréhension des phrases</u>	Altérée	Altérée si phrase complexe	Altérée si phrase longue
<u>Répétition de mots</u>	Intacte	Altération modérée si mots polysyllabiques sinon intacte	Relativement intacte
<u>Répétition de phrases</u>	Intacte	Laborieuse, notamment si grammaire complexe	Altérée
<u>Lecture</u>	Dyslexie de surface	Dyslexie phonologique et erreurs phonétiques	Dyslexie phonologique
<u>Écriture</u>	Dysgraphie de surface	Dysgraphie phonologique	Dysgraphie phonologique

Tableau 1 : Résumé des principales caractéristiques cliniques des différentes formes d'aphasies primaires progressives. SvPPA, *semantic variant primary progressive aphasia*; nfvPPA, *non-fluent variant primary progressive aphasia*; lvPPA, *logopenic variant primary progressive aphasia*. Adapté de (Woollacott et Rohrer, 2016).

A. Le variant sémantique, svPPA

La forme sémantique représente environ 20% des cas de FTD (Johnson et al., 2005). Elle est caractérisée au niveau macroscopique par une atrophie asymétrique du lobe temporal antérieur gauche, plus particulièrement au niveau des gyrus inférieur et médian, mais aussi de l'hippocampe et de l'amygdale antérieure (Hodges et al., 1992; Mummery et al., 2000; Whitwell et al., 2005). Cette atrophie se traduit par une détérioration de la mémoire sémantique conduisant à des troubles du langage (Hodges et al., 1992).

Les patients atteints de svPPA manifestent ainsi des difficultés à identifier des objets, des concepts ou des faits, ce qui aboutit à un appauvrissement du vocabulaire qui affecte à la fois la parole et l'écriture (Warrington, 2007). D'un point de vue clinique, les patients atteints de svPPA présentent un discours fluide et ont tendance à être bavard et difficile à interrompre.

De plus, ces patients utilisent fréquemment des phrases imprécises pour définir certains mots (phrases circonlocutoires) et décrivent une paraphrasie sémantique (utilisation d'un mot proche mais incorrect, e.g. « chat » pour « chien ») afin de compenser la perte de vocabulaire (pour revue (Hodges et Patterson, 2007)). Avec l'évolution de la pathologie et l'atteinte d'autres régions cérébrales, des symptômes tels qu'une agnosie olfactive, visuelle, gustative et auditive peuvent apparaître. Par ailleurs, des difficultés à lire et écrire conduisant à un phénomène de dyslexie et de dysgraphie de surface sont aussi mises en évidence (pour revue (Woollacott et Rohrer, 2016)). En revanche, les études soulignent que les autres aspects du langage tels que la prosodie (intonation de la voix), la capacité à répéter des mots ou des phrases ainsi que la grammaire sont relativement peu affectés (Gorno-Tempini et al., 2011).

B. L'aphasie progressive non fluente, nfvPPA

Le variant nfvPPA compte pour environ 25% des cas de FTD (Johnson et al., 2005). La neuro-imagerie montre une atrophie du lobe frontal gauche inférieur et postérieur (Rohrer et al., 2009). A la différence des cas atteints de svPPA, les patients nfvPPA présentent un langage peu fluide et laborieux qui est notamment caractérisé par un agrammatisme marqué (Gorno-Tempini et al., 2011). Cet agrammatisme se traduit par l'utilisation de phrases courtes et simples dénuées de mots connecteurs mais aussi par des difficultés à comprendre la grammaire et donc les phrases longues et complexes (Mesulam, 2003). De plus, l'apraxie verbale observée détériore également la capacité à planifier les mouvements nécessaires à la parole (Duffy, 2007; Josephs et al., 2006), ce qui augmente les efforts nécessaires pour produire un discours et conduit à l'apparition d'un bégaiement (Kertesz et al., 2003). Par ailleurs, la prosodie de ces patients est aussi altérée ce qui affecte le rythme, l'intonation et le débit de la parole (Josephs et al., 2006). Enfin, des erreurs phonétiques, telles que l'ajout ou la substitution de certaines syllabes, sont aussi décrites chez ces patients (e.g. « paturet » au lieu de « tabouret » (Duffy, 2007)). Avec l'avancée des symptômes, les patients ont ainsi de plus en plus de difficultés à se faire comprendre ce qui peut aboutir à un mutisme progressif (Gorno-Tempini et al., 2006). Le patient compensera alors en utilisant des méthodes non-orales, comme l'écriture, pour communiquer. Néanmoins, il est important de noter que la mémoire sémantique est préservée chez les patients atteints de nfvPPA, ce qui aide à les différencier des cas de svPPA.

C. L'aphasie logopénique, lvPPA

La variant logopénique est la forme de PPA la plus récemment décrite. Chez ces patients, l'imagerie cérébrale révèle des anomalies au niveau de la jonction temporo-pariétale (Rohrer et al., 2013). La difficulté à trouver les mots lors d'un dialogue ainsi qu'une détérioration de la capacité à répéter des phrases énoncées sont les deux principales caractéristiques de cette forme de PPA (Gorno-Tempini et al., 2008). Ainsi, le débit de parole de ces patients est relativement lent car ponctué de fréquentes pauses afin de trouver les mots adéquats. Les tests oraux révèlent aussi des erreurs phonologiques dues à une diminution de la capacité à anticiper les mots suivants (e.g. « copitaine » au lieu de « capitaine ») (Woollacott et Rohrer, 2016). Ce trouble de la mémoire phonologique à court terme entraîne une gêne à la fois pour formuler de longues phrases mais aussi pour écrire. Bien qu'il présente certaines similitudes avec celui d'un patient atteint de nvPPA, le discours d'un patient atteint de lvPPA se distingue par l'absence d'agrammatisme, d'apraxie ou d'altération de la prosodie (Chare et al., 2014; Gorno-Tempini et al., 2008). Finalement, il se différencie aussi du variant sémantique puisque la compréhension des mots est bien préservée.

III. *Les troubles moteurs associés*

Les FTLD sont parfois associées à des difficultés motrices, incluant un syndrome corticobasal (CBS, pour *corticobasal syndrome*), une PSP, un syndrome parkinsonien, et/ou une maladie des motoneurones (MND, pour *motor neuron disease*) (Lomen-Hoerth et al., 2002; Padovani et al., 2007). Ces troubles peuvent apparaître soit avant, après ou bien de manière simultanée avec les troubles cognitifs, ce qui rend le diagnostic d'autant plus complexe. Seuls les symptômes cliniques seront décrits dans cette partie.

A. Le syndrome corticobasal

Les patients atteints de CBS sont caractérisés par une bradykinésie (réduction de la vitesse d'exécution et de la spontanéité des mouvements), une rigidité, un tremblement ou encore par une dystonie des membres (trouble du tonus musculaire). Ces symptômes n'affectent généralement qu'un seul côté du corps au début de la maladie avant de s'étendre avec l'évolution de la pathologie. Chez les patients CBS, les troubles cognitifs se manifestent généralement sous la forme du nvPPA (Sha et al., 2006).

B. La paralysie supranucléaire progressive

La PSP se caractérise par une ophtalmoplégie verticale supranucléaire qui se traduit par une difficulté à regarder de haut en bas. En outre, une instabilité posturale, une rigidité axiale ainsi qu'une bradykinésie sont aussi décrites. Bien que les déficits cognitifs soient relativement modérés chez les patients PSP, certains cas présentent des signes cliniques caractéristiques d'une bvFTD ou d'une nfvPPA (Sha et al., 2006).

C. Syndrome parkinsonien lié au chromosome 17

La FTDP-17 (pour *frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17*) représente une forme héréditaire de FTLN causée par une mutation du gène *MAPT*. Elle se caractérise par des troubles du comportement ainsi que par une altération cognitive et motrice. Ces troubles moteurs se distinguent notamment des autres types de FTLN par la présence d'un syndrome parkinsonien (hypertonie, akinésie et tremblement).

D. Les maladies du motoneurone associées aux FTLN, focus sur l'ALS

Habituellement, la FTLN affecte relativement peu les régions du cortex impliquées dans le contrôle des mouvements. Cependant, dans 10 à 15% des cas, les patients peuvent développer une maladie des motoneurons dont la plus courante est l'ALS. Le syndrome est alors désigné sous le terme de FTLN-MND ou FTLN-ALS (Lomen-Hoerth et al., 2002). De manière similaire, 50% des cas de MND développent des troubles cognitifs ou comportementaux (Ringholz et al., 2005). Ainsi, l'ALS et la FTLN sont aujourd'hui considérées comme les deux extrémités d'un même processus neurodégénératif (pour revue, (Ling et al., 2013b)). Plus rarement, d'autres types de MND affectant spécifiquement les motoneurons supérieurs (atrophie musculaire primaire) ou inférieurs (sclérose latérale primaire, PLS) peuvent également être observés chez les patients FTD (Devenney et al., 2015).

L'ALS est une maladie neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence rapide et progressive des motoneurons supérieurs et inférieurs situés respectivement dans le cerveau et la moelle épinière. Au niveau clinique, cette dégénérescence se traduit par des troubles moteurs ainsi qu'une faiblesse musculaire qui aboutit finalement à une atrophie progressive des muscles. Par ailleurs, en fonction de l'atteinte des motoneurons, les symptômes peuvent se manifester de façon unilatérale ou bilatérale. Avec le développement de la pathologie, tout

le système moteur est finalement touché et conduit à une paralysie. Néanmoins, il existe une grande hétérogénéité phénotypique chez les patients atteints d'ALS (Swinnen et Robberecht, 2014).

Les similarités entre l'ALS et la FTLD ne s'arrêtent pas seulement à la clinique. En effet, il existe également un chevauchement concernant les causes génétiques et la base moléculaire de ces deux syndromes. Le principal point commun fut découvert en 2006, lorsque TDP-43 fut identifiée comme le principal constituant des lésions d'ubiquitine retrouvées chez les patients atteints de FTLD ou d'ALS (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Cette découverte sera notamment suivie de l'identification de plusieurs mutations du gène TARDBP comme responsable de 5% des cas familiaux d'ALS (Kabashi et al., 2008). Finalement, l'identification d'une expansion hexanucléotidique GGGGCC au sein du gène *C9ORF72* comme principale cause commune génétique de FTLD et d'ALS ne laissa plus de doute sur le lien entre ces deux syndromes (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Ainsi, la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'ALS permet de comprendre ceux qui sous-tendent les FTLD et inversement. C'est pourquoi l'ALS sera mentionnée régulièrement tout au long de cette introduction, notamment dans les chapitres 4, 5 et 6 qui traiteront, en partie, des bases moléculaires et de mutations génétiques communes aux deux syndromes.

IV. *Diagnostic et traitements*

A. **Diagnostic**

Etablir le diagnostic exact est un des enjeux majeur dans le domaine des FTLD, à la fois pour les cliniciens et les patients souffrant de cette pathologie. Cela permet notamment de prescrire les traitements pharmacologiques, qui diffèrent de ceux de la MA ou des maladies psychiatriques, de manière appropriée. Par ailleurs, cela permet également d'adapter l'aide nécessaire au patient en le guidant vers les spécialistes adéquats et en avisant les aidants des spécificités de cette maladie. A l'exception de certains cas associés à des mutations génétiques, il n'existe actuellement pas de test biologique permettant le diagnostic des FTLD avec certitude. Néanmoins, grâce aux récentes avancées concernant la compréhension de la base moléculaire des FTLD, des techniques permettant de détecter les acteurs impliqués dans cette pathologie commencent à émerger (pour revue, (Gordon et al., 2016)). Le diagnostic repose ainsi principalement sur un ensemble de tests neuropsychologiques basés sur les récents consensus mais également sur l'imagerie médicale.

1) **Examen neuropsychologique**

Un examen neuropsychologique poussé permet de définir avec précision les signes cliniques chez un patient suspecté de développer une FTLD, notamment en éliminant de potentiels désordres psychiatriques. Cet examen prend généralement plusieurs heures et nécessite un neuropsychologue qualifié. La présence d'un spécialiste des pathologies liées au langage peut aussi être requise lorsqu'une PPA est suspectée. La difficulté est d'autant plus considérable chez les cas qui présentent aussi des troubles moteurs (FTLD-ALS, PSP...) et nécessite de plus en plus une hyperspécialisation des neurologues. Parmi les tests utilisés, le MMSE (pour *mini mental state examination*) permet d'évaluer les fonctions cognitives globales alors que le test BREF (batterie rapide d'efficacité frontale) se focalise sur les fonctions frontales (Dubois et al., 2000) (voir **Annexe** pour le détail des tests). Cependant, lorsque les symptômes sont mineurs, ces tests ne permettent pas toujours d'émettre un diagnostic avec certitude. C'est pourquoi l'imagerie médicale se révèle un outil déterminant pour établir le diagnostic.

2) Imagerie médicale

Les progrès concernant l'identification des régions cérébrales atrophiées dans les FTLD ainsi que l'amélioration des techniques de neuro-imagerie permet aujourd'hui une meilleure identification des divers syndromes liés aux FTLD. L'IRM permet notamment de mettre en évidence une atrophie frontotemporale sans atteinte des autres régions cérébrales (**Figure 5**). Cependant, l'IRM n'est pas toujours suffisante pour identifier l'atrophie et l'utilisation de la tomographie par émission de positron (TEP) – qui permet de révéler des changements de métabolisme du glucose au sein du cerveau – peut être envisagée (**Figure 5**). Ce type d'imagerie est en effet plus sensible et permet de détecter des changements de façon plus précoce en comparaison avec l'IRM. Néanmoins, son coût est également plus élevé. Finalement, l'utilisation combinée de ces deux techniques permettrait d'obtenir une sensibilité encore plus importante (Buhour et al., 2016).

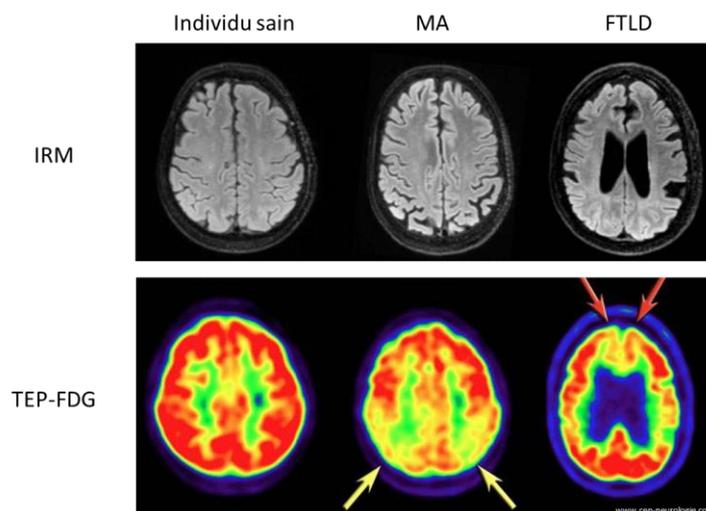


Figure 5 : Atrophie et hypométabolisme du glucose dans le lobe frontal de patients FTLD. FTLD, *frontotemporal lobar degeneration* ; IRM, imagerie par résonance magnétique ; MA, maladie d'Alzheimer ; TEP-FDG, tomographie par émission de positron utilisant le fluorodesoxyglucose marqué au fluor 18.

3) Autres tests

La ponction lombaire peut être utilisée afin d'éliminer d'autres pathologies présentant certaines similitudes cliniques avec les FTLD (infection, maladie auto-immunes...). De plus, évaluer la quantité de protéines Tau totales, hyperphosphorylées ou de peptides A β dans le liquide-céphalo-rachidien peut permettre de différencier les cas de FTLD de ceux développant une MA (Rostgaard et al., 2015). Bien qu'ils se révèlent normaux la plupart du temps, des examens électro-physiologiques peuvent également exclure certaines pathologies. Chez

certains cas de PPA, des changements dans l'électroencéphalogramme peuvent aussi être observés (Neary et al., 1998). Finalement l'électromyogramme peut être indiqué si des dysfonctionnements moteurs sont soupçonnés.

B. Traitements actuels

Malheureusement, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif ou permettant de ralentir la progression de la maladie. De plus, nous avons vu précédemment que les symptômes cliniques des FTLD sont très variés et que certains sont retrouvés dans d'autres pathologies comme la MA. En conséquence, certains traitements prescrits sont parfois inefficaces et conduisent à des effets secondaires inutiles. Par exemple, les inhibiteurs de cholinestérase, utilisé habituellement pour traiter les patients atteints de MA ou de maladie de Parkinson, peuvent favoriser le comportement agressif chez les patients FTLD (O'Brien et al., 2011). Néanmoins, avec les récentes avancées sur la compréhension de la base moléculaire des FTLD, des pistes thérapeutiques ont récemment émergé. Ces stratégies visent essentiellement à prévenir les modifications pathologiques associées aux différentes protéines qui s'agrègent dans les FTLD (pour revue, (Tsai et Boxer, 2016)). Par exemple, le bleu de Méthylène – une molécule bloquant les interactions Tau-Tau – est actuellement en phase clinique 3. Dans certaines sous-classes de FTLD ou une haploinsuffisance est suspectée, des molécules visant à augmenter l'expression des protéines affectées sont également en développement.

Malgré l'absence de traitement curatif, certains symptômes peuvent toutefois être traités. L'utilisation de certains médicaments ainsi que l'adaptation des conditions de vie des patients permettent d'obtenir des effets bénéfiques sur les symptômes cognitifs et comportementaux. Notamment, une bonne communication entre les cliniciens et le principal aidant permet de mieux suivre et de mieux comprendre l'utilisation et les effets des traitements prescrits. Parmi les traitements symptomatiques, l'utilisation d'inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine (ISRS), d'antidépresseurs ou de psychotiques a été bien étudiée dans le cadre des FTLD (Boxer et Boeve, 2007; Huey et al., 2006). En particulier, les ISRS se montrent relativement efficaces pour traiter les troubles comportementaux comme l'apathie, la dépression, l'agitation, l'anxiété ou encore les comportements obsessionnels compulsifs.

Les symptômes cliniques des FTLD sont très variables ce qui rend le diagnostic ou le traitement de cette pathologie difficile. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, la

recherche scientifique s'applique à identifier et à comprendre les mécanismes physiopathologiques de cette maladie afin de trouver des cibles thérapeutiques potentielles. Les découvertes de ces dix dernières années ont ainsi permis de mettre en évidence que la base moléculaire des FTLD est également très hétérogène. En effet, contrairement à la maladie d'Alzheimer où la nature des lésions est bien établie (plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires), les inclusions retrouvées au sein des cerveaux FTLD peuvent être formées de différentes protéines. Dans les chapitres suivants, nous verrons donc quels facteurs s'agrègent dans les différentes sous-classes de FTLD. Par ailleurs, nous nous pencherons également sur la composante génétique des FTLD qui joue un rôle important dans leur développement. En effet, 30 à 50% des cas présentent un historique familial alors que 10 à 15% des cas correspondent à une transmission autosomique dominante (Seelaar et al., 2008).

Chapitre 3 : Les FTLD-Tau

En 1986, une étude révéla que les lésions retrouvées dans la maladie de Pick étaient immunoréactives pour les protéines Tau hyperphosphorylées (Pollock et al., 1986). Dans le même temps, deux études mirent en évidence que ces mêmes protéines Tau hyperphosphorylées étaient les constituants principaux des lésions intra-neurales observées de la MA (Delacourte et Defossez, 1986). Aujourd’hui, l’ensemble des maladies neurodégénératives caractérisées par des inclusions constituées de protéines Tau anormalement et hyperphosphorylées est communément regroupé sous le terme de Tauopathies. Parmi ces Tauopathies, sont retrouvées les FTLD-Tau qui représentent environ 40% des cas de FTLD.

Dans ce chapitre, nous détaillerons les fonctions physiologiques de Tau puis nous nous intéresserons aux mécanismes physiopathologiques impliquées dans les FTLD-Tau, et plus particulièrement, dans la dérégulation de la protéine Tau.

I. *Structure et fonctions de la protéine Tau*

A. Expression et structure de Tau

1) Du gène à la protéine

La protéine Tau est essentiellement neuronale et appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (*Microtubule-Associated Protein* ou MAP) (Buée et al., 2000). La protéine Tau est codée par un gène unique appelé *MAPT* situé sur le chromosome 17 en position 17q21 (**Figure 6**). Dans le cerveau humain, Tau est principalement exprimée dans les neurones mais également en faible quantité dans les cellules gliales (LoPresti et al., 1995). Six isoformes de Tau, issues de l’épissage alternatif des exons 2, 3 et 10, sont exprimées dans le cerveau humain adulte (**Figure 6**). Ces isoformes diffèrent entre elles par la présence ou l’absence d’inserts N-terminaux et/ou d’un 4^e domaine de liaison aux microtubules. En effet, l’exclusion ou l’inclusion des exons 2 et 3 conduit à la production d’isoformes avec 0, 1 ou 2 inserts N-terminaux (0N, 1N ou 2N), alors l’exclusion ou l’inclusion de l’exon 10 mène à l’expression d’isoformes avec 3 ou 4 domaines de liaison aux microtubules, appelées

respectivement 3R et 4R (**Figure 6**). L'épissage étant régulé au cours du développement, seule l'isoforme la plus courte de Tau est présente au stade fœtal.

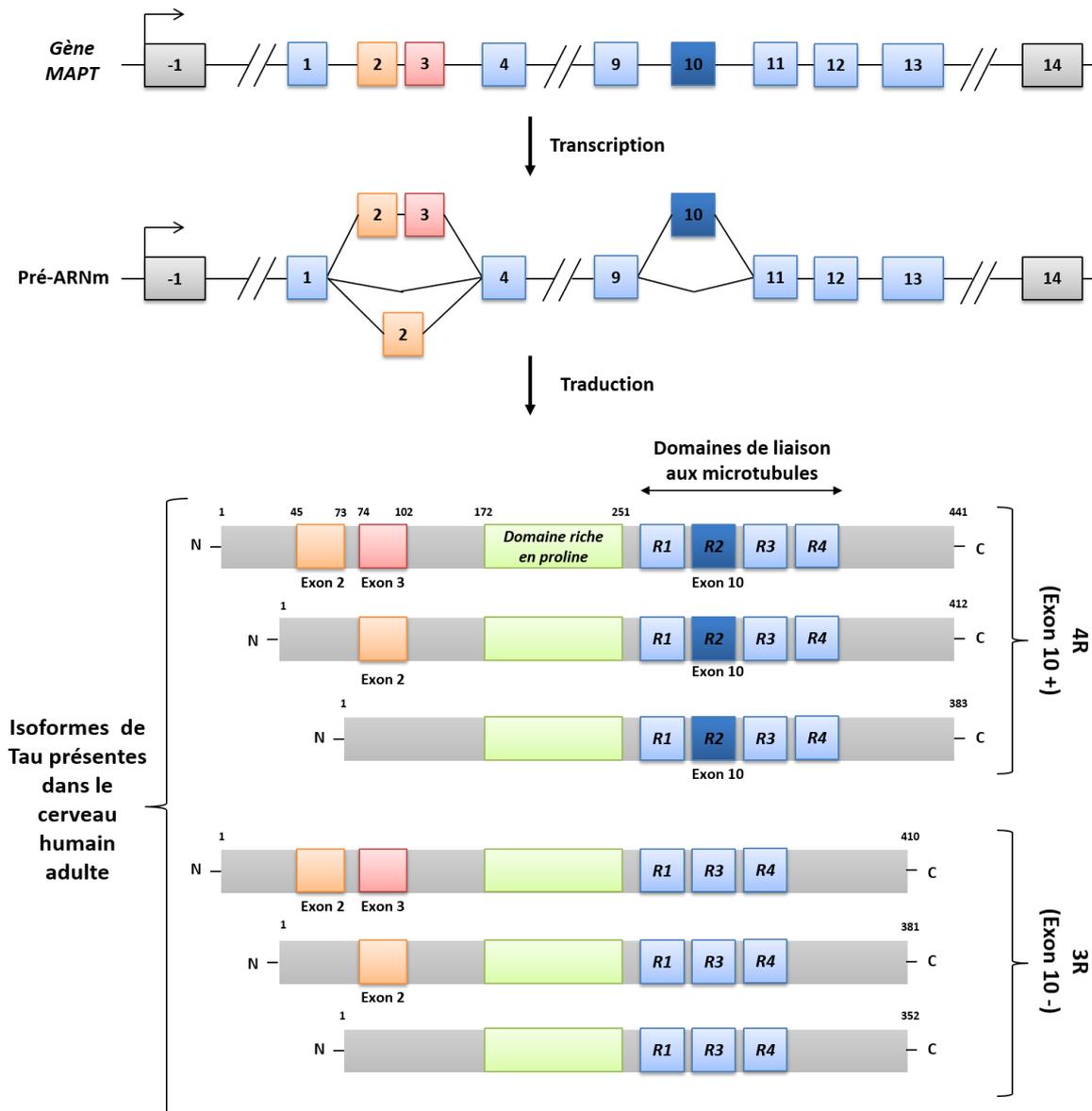


Figure 6 : Représentation schématique du gène *MAPT*, de son pré-ARNm ainsi que des 6 isoformes présentes dans le cerveau humain adulte. Le gène *MAPT*, codant pour la protéine Tau humaine contient 16 exons. Les exons 1 (E1), E4, E5, E7, E9, E11, E12 et E12 sont exprimés de façon constitutive alors que les E2, E3 et E10 subissent un épissage alternatif. Les exons E4a, E6 et E8 sont transcrits uniquement dans le système nerveux périphérique. Les six isoformes de Tau présentes dans le cerveau humain adulte sont générées à partir de l'épissage alternatif des exons E2, E3 et E10.

Concernant la distribution des différentes isoformes dans le SNC, le rapport entre les isoformes 3R et 4R est de 1 (**Figure 6**) (Buée et al., 2000; Caillet-Boudin et al., 2015). Les isoformes 2N sont minoritaires et représentent seulement 9% des protéines Tau totales contre 37% et 54% pour les isoformes 0N et 1N, respectivement (Goedert et Jakes, 1990; Trabzuni et al., 2012). Par ailleurs, l'analyse de l'expression de Tau montre des variations importantes

selon les régions cérébrales étudiées. Ainsi, le niveau d'ARN messagers (ARNm) et de protéine Tau est plus élevé au sein du néocortex en comparaison avec le cervelet ou la substance blanche (Trabzuni et al., 2012). L'épissage du pré-ARNm varie également en fonction des régions. Par exemple, la quantité de Tau 0N3R est plus faible dans le cervelet que dans les autres régions (Boutajangout et al., 2004; Trabzuni et al., 2012). Ces données expliquent en partie pourquoi la pathologie Tau affecte de manière différentielle les régions cérébrales.

2) Structure et domaines de la protéine Tau

Bien qu'elle soit le principal constituant des agrégats présents dans les Tauopathies, l'analyse par résonance magnétique nucléaire de la structure de Tau démontre une étonnante absence de conformation (Mukrasch et al., 2009). Tau est une protéine très hydrophile ce qui la rend très soluble dans l'eau. Sa forme la plus longue (441 acides aminés) contient 80 résidus sérines ou thréonine, 56 résidus chargés négativement (aspartate ou glutamate), 58 résidus chargés positivement (lysine ou arginine) et 8 résidus aromatiques (5 tyrosines et 3 phénylalanines). Tau est également extrêmement stable, et cela même en conditions acides ou à des températures élevées. Concernant sa charge, elle est relativement basique malgré la présence d'un domaine acide comprenant les 120 premiers acides aminés en position N-terminale et d'un domaine relativement neutre qui inclut 40 acides aminés de la région C-terminale (**Figure 7**).

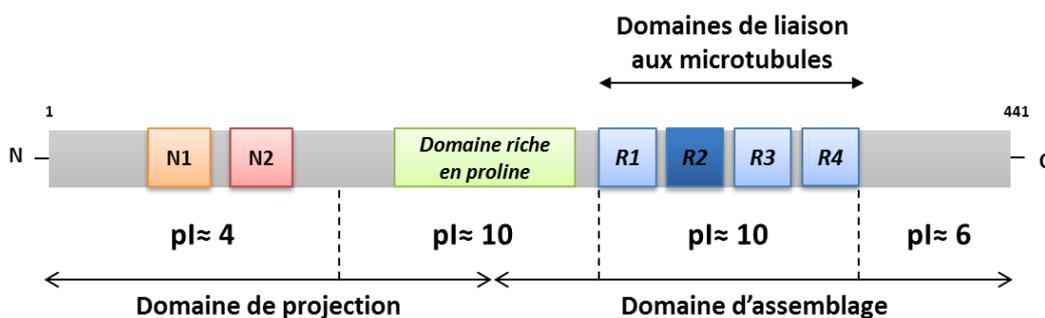


Figure 7 : Structure primaire de l'isoforme de Tau la plus longue (isoforme 2N4R). Dans le SNC, l'isoforme la plus longue de Tau comporte 441 acides aminés. Le domaine de projection comprend une région N-terminale acide ainsi que la première partie du domaine riche en proline. Le domaine d'assemblage aux microtubules est composé lui de la deuxième partie du domaine riche en proline, des motifs répétés et d'une queue carboxy-terminale relativement neutre. pI= point isoélectrique.

Cette asymétrie de charge joue un rôle important dans les interactions entre la protéine Tau, les microtubules ainsi que ses autres partenaires mais également dans sa capacité à

s'agréger. La structure de la protéine Tau peut être divisée en deux grands domaines appelés domaine d'assemblage et domaine de projection (**Figure 7**). Le domaine d'assemblage comprend la partie C-terminale de la protéine et inclut les motifs répétés de liaison aux microtubules. Il est ainsi principalement impliqué dans la liaison de Tau aux microtubules. Le domaine de projection, comprenant la partie N-terminale de Tau, est quant à lui responsable de l'espacement entre les microtubules (Chen et al., 1992). Ces deux domaines sont liés par une région riche en proline servant notamment de site d'interaction avec les autres protéines (Lee et al., 1998).

B. Fonctions physiologiques

L'étude de la protéine Tau débuta dans les années 1970, lorsque l'équipe de Weingarten décrivit une protéine essentielle à l'assemblage et à la stabilisation des microtubules (Weingarten et al., 1975). Cette fonction de régulateur de la dynamique microtubulaire lui confère un rôle indirect dans la modulation du transport axonal. Cependant, de récentes études ont également mis en évidence des fonctions de Tau dans les compartiments synaptiques et nucléaires.

1) Fonctions axonales

Dans les neurones adultes, la protéine Tau est principalement localisée dans les axones ou elle interagit avec les microtubules par l'intermédiaire de ces 3 ou 4 domaines de liaison (R1 à R4, **Figure 7 et Figure 8**) (Himmler et al. 1989; Lee et Neve 1989). Au même titre que les microfilaments d'actine, les microtubules font partie du cytosquelette qui a pour fonction d'assurer le maintien de la structure cellulaire. Au niveau de leur organisation, les microtubules sont constitués d'hétérodimères de tubuline (α et β) qui forment les protofilaments. C'est l'association de ces protofilaments de façon hélicoïdale qui aboutit à la formation d'un cylindre de 25nm appelé microtubule (**Figure 8**). Par ailleurs, les microtubules se caractérisent aussi par une structure polarisée avec la présence d'une extrémité chargée positivement et d'une autre chargée négativement. Cela a pour conséquence de rendre la structure des microtubules dynamique et labile avec une élongation (phase de polymérisation) et un raccourcissement (phase de dépolymérisation) perpétuel. Ainsi, en se fixant sur les microtubules, la protéine Tau favorise leur polymérisation et stabilise le réseau microtubulaire (Drechsel et al., 1992).

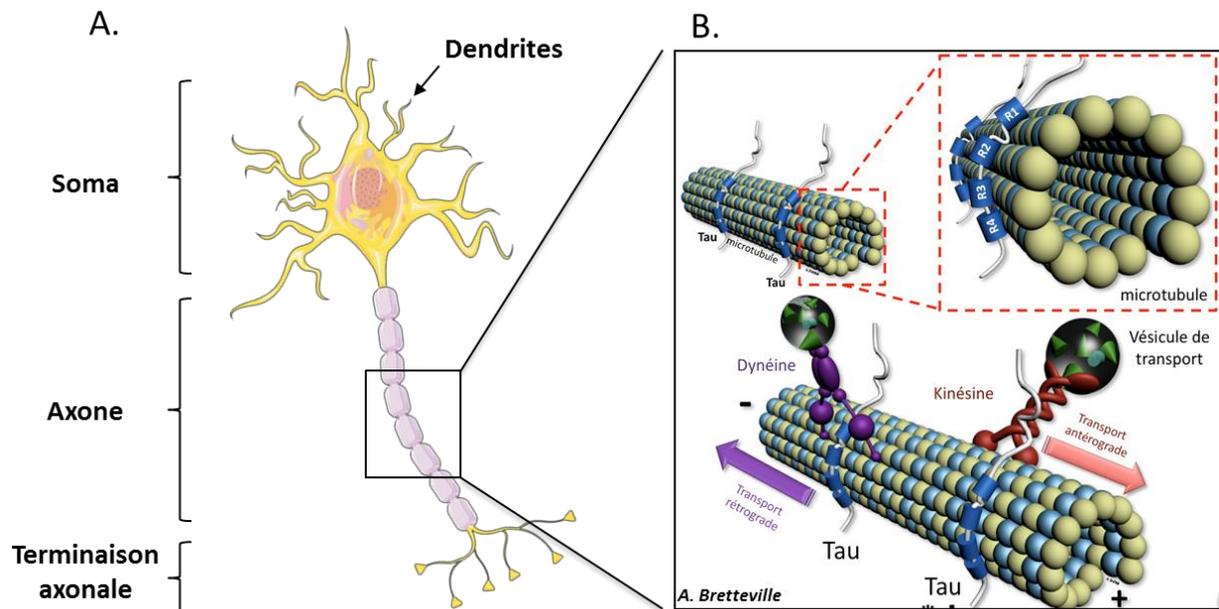


Figure 8 : Représentation schématique de Tau interagissant avec un microtubule et du transport axonal au sein du neurone. (A) Le neurone est une cellule spécialisée et polarisée constituée d'un compartiment somatique, d'un axone et de terminaisons synaptiques. (B) La protéine Tau est capable de se lier aux microtubules par l'intermédiaire de ces domaines de liaison (R1 à R4, en bleu). Cette interaction module l'activité de la kinésine et de la dynéine, qui assurent respectivement le transport axonal antérograde et rétrograde.

A côté de son rôle dans la régulation de la dynamique microtubulaire, Tau peut moduler le transport axonal de différentes manières. Cela s'explique par sa capacité à influencer sur le fonctionnement de la kinésine et de la dynéine, qui sont responsables du transport de vésicules ou d'organites (appelés cargos) vers les terminaisons synaptiques (transport antérograde) ou le soma (transport rétrograde), respectivement. Premièrement, en s'associant aux microtubules, Tau peut rentrer en compétition avec ces protéines motrices ce qui conduit à un ralentissement du transport antérograde et rétrograde (Dixit et al., 2010). Deuxièmement, Tau peut interférer avec le transport des cargos en réduisant le nombre de protéines motrices engagées dans leur transport (Vershinin et al., 2007). Troisièmement, en tant que cargo, Tau diminue la prise en charge des autres cargos et affecte ainsi leur transport (Konzack et al., 2007; Utton et al., 2005). Quatrièmement, Tau peut réguler le relargage des cargos par la kinésine en activant la protéine phosphatase 1 (PP1) et la glycogène synthase kinase 3-beta (GSK-3 β) grâce à son domaine N-terminal (Kanaan et al., 2011). Enfin, en interagissant avec la sous-unité p150 de la dynactine, Tau facilite son interaction avec les microtubules. Cela a pour conséquence de favoriser l'interaction de la dynéine avec les microtubules, renforçant ainsi le transport médié par cette protéine motrice (Lukavsky et al., 2013). Cependant, bien que ces études suggèrent un rôle important de Tau dans le transport axonal *in vitro* et *in*

cellulo, les modèles murins déficients ou surexprimant Tau ne semblent pas présenter de troubles majeurs du transport axonal (Yuan et al., 2008). Ces données *in vivo* indiquent donc qu'un mécanisme de compensation pourrait exister, comme l'expression de MAP1A, pour pallier l'absence de Tau (Harada et al., 1994).

Finalement, la protéine Tau semble aussi essentielle à l'élongation et la maturation des axones. En effet, une étude a montré que l'absence de Tau dans des cultures primaires neuronales de rat inhibait la formation des prolongements neuritiques (Caceres et Kosik, 1990). A l'inverse, sa surexpression promeut leur formation, et ce, même au sein de cellules non-neuronales (Knops et al., 1991).

2) Fonctions nucléaires

Bien que principalement axonale, Tau a également été retrouvée localisée au sein du noyau (Loomis et al., 1990). Ainsi, des études *in cellulo* ont souligné que Tau pouvait se lier à l'ADN au niveau du nucléole, suggérant un rôle de la protéine Tau dans le réarrangement nucléolaire (Sjöberg et al., 2006). En outre, le laboratoire a montré que la protéine Tau était impliquée dans le maintien de l'intégrité des acides nucléiques, et ce, en condition physiologique ou de stress (Sultan et al., 2011). En effet, en l'absence de Tau, une accumulation des dommages à l'ADN et aux ARN est observée dans des cultures primaires neuronales de souris (Violet et al., 2014).

3) Fonctions synaptiques

La protéine Tau est aussi présente en faible quantité au niveau des synapses. Son rôle a principalement été décrit au niveau des épines dendritiques, où elle favoriserait l'excitotoxicité dans un modèle de pathologie amyloïde (Ittner et al., 2010). Bien que son rôle en condition physiologique soit moins bien caractérisé, des preuves de l'implication de Tau à la synapse ont récemment vu le jour. Ainsi, dans un modèle murin déficient pour Tau, un défaut de LTD (pour *long-term depression*) – un mécanisme réduisant l'efficacité de l'activité synaptique – a pu être observé dans la région CA1 (Corne d'Ammon 1) de l'hippocampe, à la fois *in vivo* et *ex vivo* (Kimura et al., 2014). Ce résultat contraste avec une autre étude qui souligne une altération de la LTP (pour *long-term potentiation*), le mécanisme antagoniste de la LTD, dans un modèle similaire (Ahmed et al., 2014). Bien que contradictoire, ces deux études supportent une fonction de Tau dans la régulation de l'activité synaptique.

4) Autres fonctions

L'utilisation de modèles animaux déficients pour Tau a également permis de mettre en évidence d'autres fonctions de Tau. Des études ont ainsi montré que l'absence de Tau dans un modèle murin induisait une altération de la migration des progéniteurs neuronaux ou de la neurogenèse hippocampique (Lei et al., 2014). D'autre part, une accumulation intraneuronale de fer ainsi qu'une mort neuronale au sein de la substance noire conduisant à un déclin des fonctions locomotrices ont été observées chez des souris *MAPT*^{-/-} âgées de 12 mois (Lei et al., 2012). Enfin, Tau serait aussi capable d'interagir avec les filaments d'actine afin d'induire leur réorganisation. En effet, une co-localisation de Tau avec l'actine a été observée au niveau des cônes de croissance neuritique, soulignant un rôle de Tau dans le développement des prolongements neuronaux (Biernat et al., 2002; Whiteman et al., 2009).

II. *Modifications post-traductionnelles*

Les modifications post-traductionnelles (MPT) sont des modifications chimiques affectant les protéines. Ces modifications chimiques, résultant de l'activité de différentes enzymes, peuvent se présenter sous différentes formes incluant l'addition d'un groupe fonctionnel (acétylation, glycosylation, phosphorylation) ou d'une protéine (ubiquitinylation, sumoylation), le changement de la nature d'un acide aminé (déamidation, déimination) et des changements structuraux (isomérisation, troncation, oxydation et réduction des ponts disulfures). Ces MPT affectent l'activité, la localisation subcellulaire, la stabilité ou la structure de la protéine ciblée.

Tau est sujette à de nombreuses MPT : phosphorylation, acétylation, méthylation, isomérisation, glycation, nitration, ubiquitinylation, sumoylation, O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNAc) et troncation. Parmi ces MPT, certaines ne sont retrouvées qu'en conditions pathologiques (troncation, glycation, polyamination) alors que d'autres, essentielles aux fonctions physiologiques de Tau, se retrouvent dérégulées dans la MA et les autres Tauopathies (phosphorylation, glycosylation, nitration). Ainsi, une dérégulation globale des MPT de Tau est l'une des hypothèses principales par laquelle la protéine Tau devient une entité pathologique dans les Tauopathies.

A. Phosphorylation

La phosphorylation consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur les acides aminés sérine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y) d'une protéine. Elle constitue la modification post-traductionnelle la plus commune et la plus étudiée de la protéine Tau. En effet, parmi les 85 sites potentiels de phosphorylation (80 résidus sérine ou thréonine et 5 résidus tyrosine) présents sur l'isoforme la plus longue de Tau, 45 ont été validés expérimentalement. La majorité de ces résidus sont situés de part et d'autre des régions de liaison aux microtubules (Noble et al., 2013). Ainsi, il n'est pas surprenant que la phosphorylation joue un rôle crucial dans la régulation des fonctions physiologiques de Tau, et particulièrement dans sa capacité interagir avec les microtubules (Bramblett et al., 1993). C'est pourquoi l'état de phosphorylation de Tau est finement régulé et va dépendre d'un équilibre entre l'activité des kinases et des phosphatases (**Figure 9**). C'est notamment le dérèglement de cette balance qui est à l'origine de l'hyperphosphorylation des protéines Tau en conditions pathologiques (Gong et al., 1993) (voir ci-dessous).

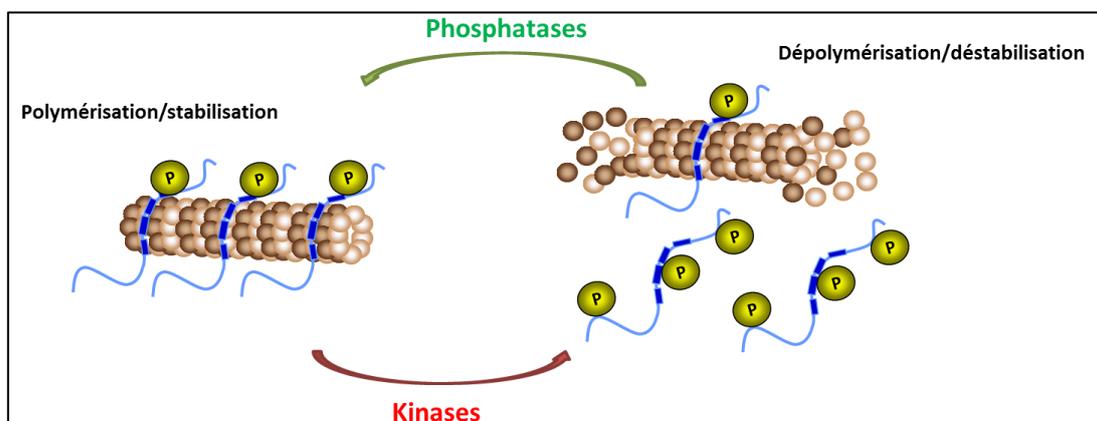


Figure 9 : Régulation de la dynamique microtubulaire selon l'état de phosphorylation de la protéine Tau. L'augmentation de phosphorylation de la protéine Tau diminue sa capacité à se lier aux microtubules. L'état de phosphorylation de Tau est finement régulé et dépend de l'activité des protéines kinases et phosphatases. Ces dernières jouent ainsi un rôle essentiel dans l'interaction de Tau avec les microtubules.

B. Autres modifications

La troncation est également une MPT importante de la protéine Tau. Les principaux sites de troncation connus de Tau sont situés en position E391 et D421, mais il existe également d'autres fragments secondaires (Derisbourg et al., 2015). Le rôle de ces formes tronquées n'est pas toujours bien clair, cependant, de nombreuses études indiquent qu'ils

joueraient un rôle dans l'agrégation de la protéine Tau (Horowitz et al., 2004; Zhang et al., 2014).

La protéine Tau est aussi la cible de diverses MPT comme l'acétylation, la glycosylation, la glycation, la déamidation, l'isomérisation, la nitration, la méthylation ou encore la sumoylation. Comme la phosphorylation, ces MPT ont des conséquences sur le fonctionnement de la protéine Tau et peuvent modifier la propension de Tau à s'agréger. Par exemple, alors que la N-glycosylation semble favoriser l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau (Liu et al., 2002a), la O-GlcNacylation serait plutôt protectrice (Yuzwa et al., 2014).

III. *Tau et les FTLD-Tau*

La protéine Tau est impliquée dans de multiples fonctions essentielles au fonctionnement des neurones. Ces fonctions sont finement régulées par un ensemble de MPT décrites précédemment. Par la suite, nous verrons comment la dérégulation de ces modifications, notamment l'hyperphosphorylation, contribue aux processus physiopathologiques qui conduit à un gain de fonction toxique et/ou une perte de fonction physiologique de Tau.

A. Physiopathologie de la protéine Tau

1) Hyperphosphorylation et perte de fonction de Tau

Nous avons vu précédemment que la phosphorylation était une MPT majeure de la protéine Tau. Dans le cerveau des patients atteints de FTLD-Tau, la phosphorylation de Tau est dérégulée et les protéines sont hyper- et anormalement phosphorylées (pour revue (Buée et Delacourte, 1999)). L'hyperphosphorylation consiste en l'augmentation du nombre de groupement phosphate sur des sites phosphorylés en condition physiologique. La phosphorylation anormale correspond quant à elle à la phosphorylation d'épitopes de la protéine Tau en condition pathologique uniquement. Néanmoins, certaines études indiquent que seule l'hyperphosphorylation serait pertinente (Matsuo et al., 1994; Morris et al., 2015). En effet, l'étude de la phosphorylation de Tau au sein de biopsie de cerveau humain révèle que Tau est phosphorylée aux mêmes épitopes que les protéines Tau agrégées. Cela peut s'expliquer notamment par le fait que les phosphatases peuvent déphosphoryler les protéines Tau solubles lors du délai post-mortem, mais pas celles piégées au sein des agrégats (Matsuo

et al., 1994). Dans tous les cas, l'élévation du niveau de phosphorylation de Tau conduit à une dérégulation de ses fonctions (**Figure 10**).

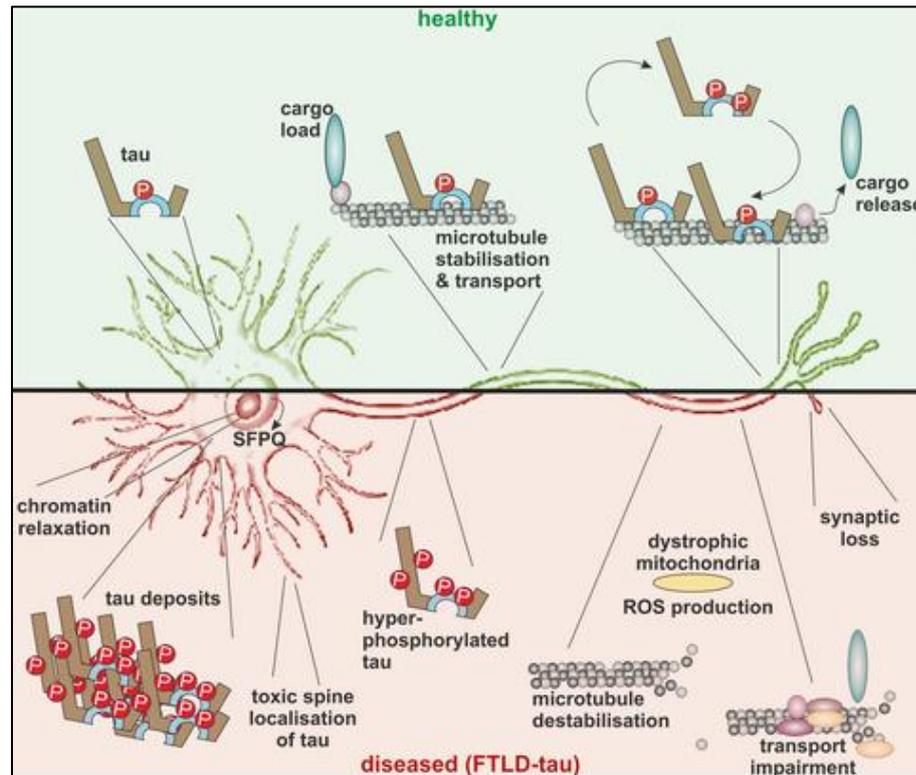


Figure 10 : Tau en conditions physiologique ou pathologique. En condition physiologique (en haut), les protéines Tau sont principalement localisées dans les axones. Le transport des protéines cargo est particulièrement affecté par la présence ou non de Tau. Dans les FTLD-Tau, et dans les Tauopathies en général, la dérégulation de Tau conduit à un dysfonctionnement neuronal. Issue de (Bodea et al., 2016).

Premièrement, la phosphorylation de Tau sur les épitopes S214 et S216 induit une diminution de son affinité pour les microtubules et donc son détachement (Schneider et al., 1999). Cela a pour conséquence de déstabiliser le réseau microtubulaire (Li et al., 2007) et donc altérer le transport axonal et l'intégrité synaptique (Cowan et al., 2010; Mandelkow et al., 2003). Deuxièmement, il a été observé que l'hyperphosphorylation de Tau réduit la protection de l'ADN et l'intégrité génomique (Lu et al., 2013). Troisièmement, l'hyperphosphorylation peut provoquer une redistribution des protéines Tau de l'axone vers le compartiment somatodendritique, ce qui engendre un dysfonctionnement synaptique (Hoover et al., 2010). Quatrièmement, la phosphorylation de Tau conduirait à une altération de sa dégradation par les voies autophagiques et lysosomales, mais également de sa troncation. En effet, une étude *in vitro* indique que la phosphorylation sur le résidu sérine 422 inhibe le clivage de Tau par la caspase 3 (Guillozet-Bongaarts et al., 2006). De plus, la protéine Tau phosphorylée sur les résidus sérine 262 et 356 n'est plus reconnue par le complexe CHIP-

HSP70 ce qui diminue sa capacité à être dégradée par le protéasome (Dickey et al., 2007). Enfin, l'hyperphosphorylation de Tau modifierait également sa capacité à interagir avec ses partenaires protéiques (Ittner et al., 2010).

2) Agrégation et gain de fonction toxique

L'augmentation de la phosphorylation de Tau conduit à une modification conformationnelle qui favorise le passage de Tau d'un état soluble à un état insoluble. En effet, l'analyse de la structure des PHF (pour *paired helical filaments*) – agrégat filamenteux constitué de protéines Tau – observés dans la MA révèle que ces derniers sont principalement constitués de formes phosphorylées de la protéine Tau (Grundke-Iqbal et al., 1986). Par ailleurs, il a été montré que la déphosphorylation de Tau induit une dissociation de ces PHF (Wang et al., 1996). De plus, du fait de leur détachement des microtubules, les protéines Tau hyperphosphorylées se révèlent capables d'induire l'agrégation des formes normales de Tau (Alonso et al., 1996). Néanmoins, des études indiquent que la phosphorylation de Tau sur les résidus S214 et S262, bien qu'induisant un détachement de Tau des microtubules, protège contre l'agrégation (Schneider et al., 1999). Finalement, *in vivo*, une hyperphosphorylation est observée chez les animaux en hibernation, et ce, en l'absence d'agrégats (Arendt et al., 2003). Ainsi, les données actuelles suggèrent que la phosphorylation seule ne serait pas suffisante pour induire l'agrégation.

La troncation semble également impliquée dans le processus d'agrégation de Tau. En effet, un déséquilibre entre la production des formes tronquées de Tau par les caspases/calpaïnes et leur clairance, conduit à l'accumulation de ces formes (pour revue, (Chesser et al., 2013)). Du fait de leur tendance à s'oligomériser, ces formes participent ainsi à la formation des agrégats de Tau (de Calignon et al., 2010). La corrélation entre la présence d'agrégats et les troubles cognitifs à long terme suggère que les agrégats étaient responsables de la toxicité (pour revue (Wang et Mandelkow, 2015)). Cependant, des études plus récentes suggèrent que ce sont les formes oligomériques de Tau, plus solubles, qui joueraient un rôle majeur dans le processus neurodégénératif (Flach et al., 2012; Tian et al., 2013). Les formes agrégées constitueraient ainsi un mécanisme protecteur pour prévenir la toxicité induite par les formes oligomériques de Tau (Alonso et al., 2006). Cette hypothèse est notamment supportée par une étude de 2014. Celle-ci montre en effet que le blocage des formes oligomériques de Tau, par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques, supprime le phénotype pathologique dans un modèle murin de Tauopathie (Castillo-Carranza et al., 2014).

3) Propagation de la pathologie Tau, l'hypothèse prion

La progression spatio-temporelle de la pathologie Tau dans la MA, qui débute dans le *locus coeruleus* du tronc cérébral et s'étend à tout le cortex (stades de Braak, (Braak et Braak, 1991)), suggère la propagation de la pathologie d'une région cérébrale à une autre par l'intermédiaire des réseaux neuronaux (Braak et al., 2011). En revanche, cet aspect est moins évident dans le cas des FTLT-D-Tau, bien que des schémas de propagation aient été proposés, notamment pour la PSP et l'AGD (Saito et al., 2004; Williams et al., 2007).

L'hypothèse principale concernant la progression de la pathologie Tau est l'implication d'un mécanisme de propagation de type prion. Cette hypothèse démarre notamment d'une étude de 2009 dans laquelle des lysats de cerveaux issus de modèles murins de pathologie Tau furent injectés chez une autre souris ne présentant pas de pathologie. Au bout de 6 mois, des lésions constituées de protéines Tau hyperphosphorylées furent observées au niveau du site d'injection et dans les régions cérébrales connectées de la souris receveuse (Clavaguera et al., 2009). Cette étude suggéra ainsi que les protéines Tau pathologiques étaient capables de recruter les protéines Tau natives afin de les rendre à leur tour pathologiques. D'autres études confortèrent cette hypothèse en soulignant que l'injection de protéines Tau pathologiques, issues de cerveaux de patients atteints de PiD, MA ou AGD, provoquait l'apparition de lésions telles que des corps de Pick, des enchevêtrements neurofibrillaires (NFT), ou de grains argyrophiles, respectivement (Clavaguera et al., 2013; Sanders et al., 2014). En parallèle, l'équipe de Virginia M.-Y. Lee indiqua que l'injection de Tau fibrillaires recombinantes dans un modèle murin exprimant une forme mutée de Tau (P301S) favorisait l'apparition précoce de lésions NFT (Iba et al., 2013). Enfin, il est intéressant de noter que la protéine Tau native serait également capable de se propager (Dujardin et al., 2014a).

Afin de comprendre comment les agrégats passent d'un neurone à un autre, une équipe injecta des fibrilles de Tau recombinantes dans le cerveau de souris sauvages. Elle révéla ainsi que les protéines Tau agrégées étaient internalisées par l'intermédiaire de protéoglycanes à héparane sulfate à partir du milieu extracellulaire, un mécanisme utilisé notamment par la protéine prion (Holmes et al., 2013). D'autres études mettent en évidence que Tau pourrait être sécrétée d'un neurone à un autre par différents mécanismes, incluant les vésicules synaptiques, les exosomes (Saman et al., 2014), les ectosomes (Dujardin et al., 2014b) ou bien l'exocytose (pour revue (Clavaguera et al., 2015)). Néanmoins, bien que le

transfert synaptique constitue l'hypothèse la plus étudiée concernant la propagation de Tau, d'autres mécanismes pourraient être impliqués. C'est ce que suggère une récente étude réalisée sur un modèle murin déficient pour le récepteur microgliale à la fractalkine (Cx3Cr1) (ce qui accélère le développement de la pathologie) et exprimant la forme humaine de la protéine Tau (2N4R). En effet, dans ce modèle l'activation microgliale précède la propagation de Tau dans les régions cérébrales connectées à l'hippocampe où se développe la pathologie Tau, suggérant la neuroinflammation comme médiateur de la propagation de la pathologie (Maphis et al., 2015). Cette hypothèse est confortée par d'autres travaux montrant un ralentissement du développement de la pathologie Tau dans un modèle murin déficient en microglie (Asai et al., 2015).

Tous ces résultats suggèrent fortement l'implication d'un mécanisme de type prion dans la progression de la pathologie Tau. Néanmoins, une étude récente conteste cette hypothèse en soulignant que les protéines Tau pathologiques peuvent se propager, et ce, en même l'absence de protéine Tau endogène (Wegmann et al., 2015). Ainsi, la protéine Tau ne pourrait être considérée comme une protéine prion au sens strict du terme.

B. Classification biochimique des FTLD-Tau

L'étude des agrégats retrouvés dans les FTLD-Tau a permis de révéler des différences dans leur composition en isoformes de Tau. Ainsi, une classification biochimique a été établie en fonction de cette composition (**Figure 11**).

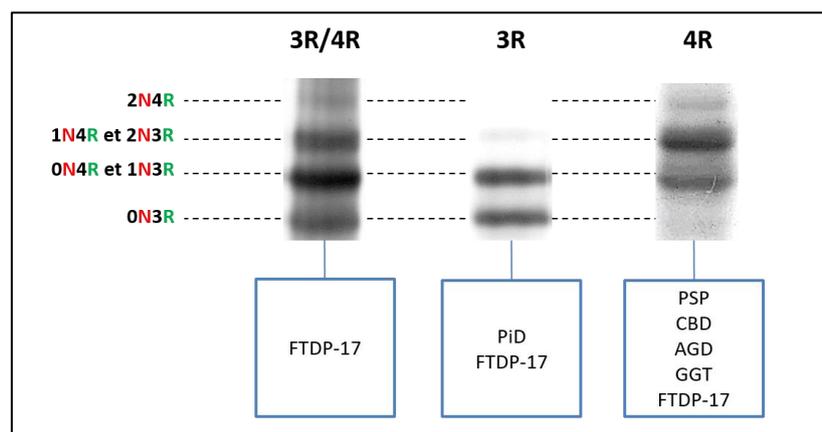


Figure 11 : Classification biochimique des FTLD-Tau. 3R, 3 repeat; 4R, 4 repeat; AGD, argyrophilic grain disease; CBD, corticobasal degeneration; FTDP-17, frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17; GGT, globular glial tauopathy; PiD, Pick's disease; PSP, progressive supranuclear palsy; Adaptée de (Sergeant et Buee, 2005).

La première catégorie correspond aux pathologies présentant des agrégats contenant les 6 isoformes de la protéine Tau comme dans certaines FTDP-17 (**Figure 11**). La deuxième catégorie comprend les pathologies où seules les isoformes 4R sont agrégées telles que la PSP. Elle s'oppose à la troisième catégorie, qui inclut la maladie de Pick, où les lésions se caractérisent par la présence uniquement d'isoformes 3R (Buée et Delacourte, 1999; Sergeant et al., 1999).

1) 3R FTL-D-Tau : Maladie de Pick

D'un point de vue clinique, la maladie de Pick se manifeste communément par une bvFTD ou une nfvPPA associée à des troubles moteurs peu communs (Piguet et al., 2011). Les principales caractéristiques histopathologiques sont la présence d'une perte neuronale importante, de neurones ballonnés (cellules de Pick), et de larges lésions cytoplasmiques argyrophiliques appelées corps de Pick (**Figure 2** et **Figure 12**). Ces corps de Pick, majoritairement composés de protéines Tau 3R, sont localisés au niveau des couches II à IV du néocortex ainsi que dans les cellules granulaires et pyramidales de l'hippocampe (Gelpi et al., 2013). Bien qu'elle ne soit pas abondante, la pathologie Tau est également retrouvée au sein des astrocytes et oligodendrocytes, sous la forme d'inclusions constituées de Tau 4R (Zhukareva et al., 2002).

2) 4R FTL-D-Tau

a) Paralyse supranucléaire progressive

Les patients PSP affichent des désordres moteurs (instabilité posturale, bradykinésie, ophtalmoplégie) qui s'accompagnent de troubles cognitifs modérés pouvant se manifester sous forme de bvFTD ou nfvPPA (Sha et al., 2006). La pathologie est caractérisée par une dégénérescence de nombreuses régions sous-corticales (striatum, pallidum, substance noire, noyau dentelé du cervelet...), le néocortex étant affecté de manière variable (Bigio et al., 1999). La PSP se caractérise par une accumulation de NFT, majoritairement dans les régions sous-corticales. Par ailleurs, une des spécificités de la PSP est la présence de plaques astrocytaires en étoile (appelés touffes astrocytaires) qui sont constituées d'un enchevêtrement de prolongements astrocytaires proximaux (**Figure 12**). Finalement, des astrocytes ramifiés, des inclusions dans les oligodendrocytes (appelé corps bobinés) ainsi que des fibres tortueuses sont également retrouvés. Toutes ces inclusions sont principalement constituées de protéines Tau 4R (Sergeant et al., 1999).

b) Dégénérescence corticobasale

Comme indiqué précédemment, les patients atteints de CBD peuvent présenter un syndrome corticobasal, une FTD (bvFTD, nfvPPA) ou bien des signes cliniques mixtes pouvant être attribués à l'un de ces deux syndromes. L'examen neuropathologique révèle une dépigmentation de la substance noire, une atrophie du pallidum et du cortex cérébelleux. Des lésions neuronales cytoplasmiques (NCI, *neuronal cytoplasmic inclusions*) composées de protéines Tau 4R sont observées au sein du cortex cérébral et de la substance blanche mais également dans des régions sous-corticales telles que les ganglions de la base et le mésencéphale (Dickson et al., 2002). Des corps bobinés et des astrocytes ramifiés, similaires à ceux trouvés chez les patients PSP ont également été mis en évidence. Par ailleurs, la CBD se distingue par la présence de plaques astrocytaires en couronne (différentes de celles en étoile trouvées dans la PSP) caractérisées par une accumulation de protéines Tau dans les prolongements distaux des astrocytes (**Figure 12**).

c) Tauopathie gliale globulaire

Les patients présentant une tauopathie gliale globulaire (ou GGT pour *globular glial tauopathy*) présentent des manifestations cliniques diverses, incluant une bvFTD, des troubles moteurs extrapyramidaux, une sclérose latérale primaire ou encore un mélange entre ces différents syndromes (Ahmed et al., 2013). Les lésions observées dans la GGT sont constituées de protéines Tau 4R. Concernant la distribution des lésions, elles sont retrouvées principalement dans la substance blanche ainsi que dans les oligodendrocytes et les astrocytes, sous forme d'inclusions globulaires (**Figure 12**). Les neurones affectés par la pathologie Tau présentent des lésions cytoplasmiques diffuses en plus des inclusions globulaires.

d) Maladie à grains argyrophiles

La maladie à grains argyrophiles (AGD, pour *argyrophilic grain disease*) se manifeste par une amnésie modérée qui peut s'accompagner de troubles émotionnels et de la personnalité. Cette démence se caractérise par la présence de grains et d'inclusions fusiformes qui sont colorés lors d'une imprégnation argentique (**Figure 12**). Ces inclusions sont situées principalement dans les prolongements neuronaux, au niveau de l'amygdale et du cortex limbique temporal. Des NFT et des corps bobinés sont aussi observés dans les régions affectées par la pathologie (pour revue, (Ferrer et al., 2008).

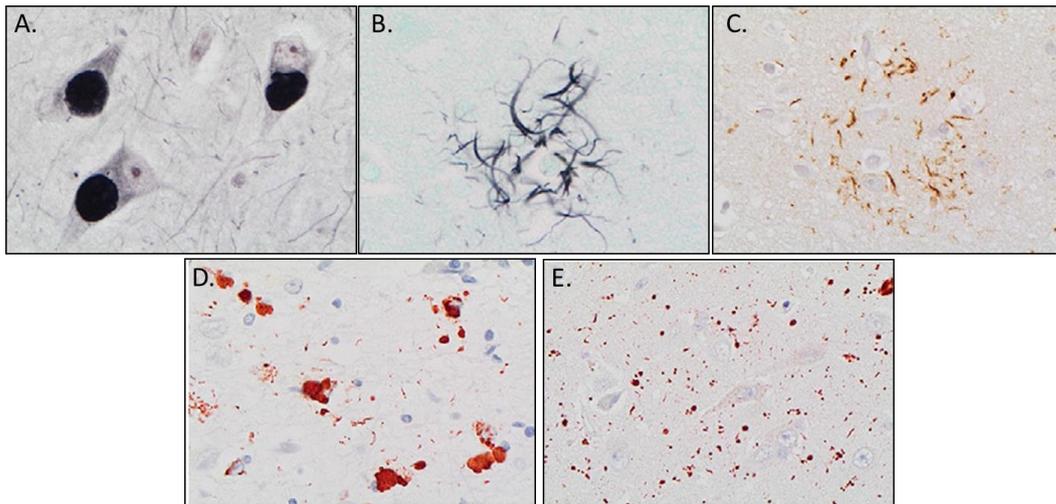


Figure 12 : Sous-classes neuropathologiques de FTLD-Tau. (A) corps de Pick, (B) touffe astrocytaire dans la paralysie supranucléaire progressive, (C) plaque astrocytaire en couronne dans la dégénérescence corticobasale, (D) inclusions gliales globulaires, (E) grains argyrophiles. Adaptée de (Mackenzie et Neumann, 2016)

IV. *Les cas héréditaires de FTLD-Tau, implication des mutations sur le gène MAPT*

A l'heure actuelle, 55 mutations pathologiques sur le gène *MAPT* ont été recensées. L'âge moyen d'apparition des symptômes chez les patients qui présentent une mutation de *MAPT* se situe entre 50 et 60 ans (Snowden et al., 2015). La durée d'évolution est comprise entre 5 et 30 ans avec une moyenne de 8 ans (Seelaar et al., 2011). Les mutations du gène *MAPT* sont la cause de cas héréditaires de FTLD qui sont associées à un syndrome parkinsonien. Ces mutations comptent pour environ 10% des cas familiaux de FTLD. Des mutations de *MAPT* peuvent également être retrouvées chez des patients CBD et PSP.

La plupart des mutations sont de type faux-sens ou de type délétion et se situent principalement au niveau des exons 1, 9-13 ou bien dans l'intron qui précède l'exon 10 (<http://www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations/>) (**Figure 13**). Ces cas héréditaires présentent certaines spécificités cliniques et neuropathologiques en comparaison avec les cas sporadiques de FTLD-Tau.

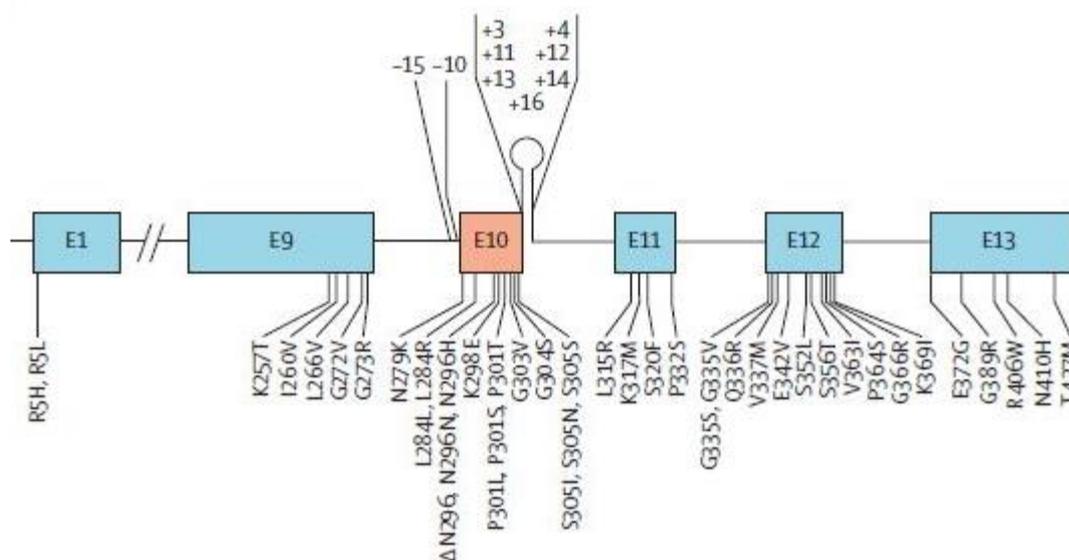


Figure 13 : Représentation de la plupart des mutations affectant le gène *MAPT* dans les FTDP-17. 42 mutations dans les régions codantes et 9 dans les régions non codantes sont représentées. Issue de (Spillantini et Goedert, 2013).

Les conséquences de mutations d'un point de vue clinique et neuropathologique sont relativement hétérogènes d'une famille à l'autre (Fujioka et Wszolek, 2011). Dans la totalité des cas, les cerveaux affectés présentent des inclusions neuronales et gliales de protéines Tau hyperphosphorylées au niveau de la substance grise et blanche des régions corticales et sous-corticales (Mackenzie et Neumann, 2016). Le phénotype clinique inclut lui généralement un ensemble de troubles de la personnalité et du comportement, un dysfonctionnement des fonctions cognitives ainsi qu'un syndrome parkinsonien. Cependant, il existe des corrélations plus spécifiques au regard du type de mutation retrouvé. Ainsi, les mutations qui affectent l'épissage alternatif de l'exon 10 conduisent généralement à une augmentation des isoformes 4R de Tau, qui est associée à une pathologie neuronale et gliale similaire à celle observée chez les patients CBD et PSP. De plus, ces cas présentent souvent un syndrome parkinsonien plus prononcé. A l'inverse, les mutations affectant les exons 9, 11, 12 et 13 aboutissent principalement à des inclusions neuronales soit de type corps de Pick constitués d'isoformes 3R de Tau ou de type NFT composés à la fois d'isoforme 3R et 4R). Cependant, comment la modification du ratio entre les différentes isoformes conduit à l'agrégation de Tau reste à éclaircir. Finalement, des études montrent que certaines mutations affectant le gène *MAPT* réduisent son affinité pour les microtubules et favorisent son agrégation (Hong et al., 1998). Ces mutations sont le plus souvent associées à un phénotype clinique de type démence (Mackenzie et Neumann, 2016).

Chapitre 4 : Les FTLD-TDP

En 2006, TDP-43 était décrit comme la protéine s'accumulant dans la majorité des cas de FTLD ne présentant pas d'inclusions de la protéine Tau comme dans la plupart des cas d'ALS (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006) (**Figure 4**). Aujourd'hui, les FTLD-TDP représentent 50% des cas de FTLD, ce qui en fait la sous-classe de FTLD la plus importante d'un point de vue moléculaire.

A l'instar du précédent chapitre, nous nous intéresserons ici aux fonctions physiologiques de TDP-43 avant d'étudier les mécanismes à l'origine de sa dérégulation en conditions pathologiques. Nous verrons également les différents sous-types de FTLD-TDP et établiront des corrélations avec la clinique. Ainsi, cela nous permettra de mieux comprendre les conséquences de l'agrégation de TDP-43 dans les FTLD-TDP. La génétique des FTLD-TDP étant complexe, un chapitre séparé lui sera consacré.

I. *Biologie de TDP-43*

A. **Structure de TDP-43**

TDP-43 est une protéine hautement conservée et principalement nucléaire codée par le gène *TARDBP* qui est localisé sur le chromosome 1. Son nom vient de sa découverte, lorsqu'elle fut identifiée comme une protéine se liant à l'élément de réponse de trans-activation (TAR) du virus de l'immunodéficience humaine (Ou et al., 1995). TDP-43 appartient à la famille des ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes (hnRNP, *heterogeneous Nuclear ribonucleoproteins*,) qui sont des protéines interagissant principalement avec les transcrits pré-messagers. Le gène *TARDBP* code une seule isoforme unique de 414 acides aminés. D'un point de vue structural, TDP-43 comporte deux domaines de fixation à l'ARN (RRM1 et RRM2; RRM pour *RNA recognition motif*) ainsi qu'une région C-terminale riche en glycine qui sert à interagir avec d'autres protéines comme les hnRNP A1/A2 et C1 (Buratti et al., 2005). Cette région a aussi la particularité de contenir un domaine de type prion (riche en glutamine/asparagine) qui joue un rôle prépondérant dans l'agrégation de TDP-43 (Fuentesalba et al., 2010; King et al., 2012) (**Figure 14**). TDP-43 dispose aussi de séquences d'exportation (NES) et de localisation (NLS) nucléaires qui sont nécessaires à son passage du noyau vers le cytoplasme et inversement (**Figure 14**).

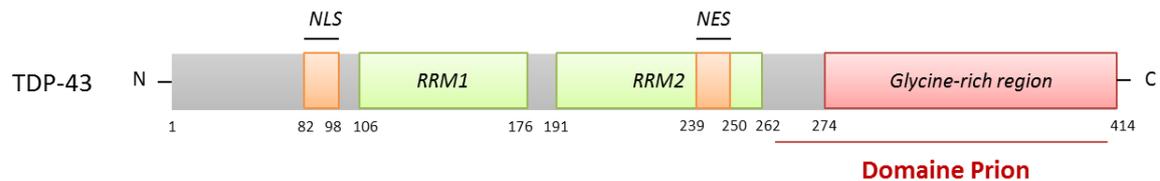


Figure 14 : Représentation schématique des différents domaines protéiques de TDP-43. NES, nuclear exportation signal; NLS, nuclear localisation signal; RRM, RNA recognition motif.

B. Fonctions physiologiques de TDP-43

A l'origine décrite comme protéine liant l'ADN, TDP-43 est aujourd'hui principalement connue pour réguler le métabolisme des acides nucléiques par différents mécanismes (**Figure 15**).

1) Fonctions nucléaires

a) Modulation de l'épissage des pré-ARNm par TDP-43

En 2001, une étude mit en évidence l'implication de TDP-43 dans l'épissage de l'exon 9 du pré-ARNm codé par le gène *CTFR* (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Buratti et Baralle 2001). Plus tard, l'utilisation de la technique de HITS-CLIP (pour *high-throughput Ssequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*) – qui permet d'identifier les ARN liés à une protéine – révéla que TDP-43 interagissait avec une grande partie du transcriptome du système nerveux central (SNC) (> 6000 ARN). De manière intéressante, la majorité de ces ARN sont impliqués dans des processus cellulaires essentiels tels que le développement neuronal, la guidance axonale et l'activité synaptique (Sephton et al., 2011). Par ailleurs, un nombre conséquent de ces transcrits présentent des modifications d'épissage chez des patients FTLN/ALS ainsi que dans des modèles murins déficients pour TDP-43 (Polymenidou et al., 2011; Tollervey et al., 2011) (**Figure 15**). TDP-43 se fixe principalement au niveau des introns et des régions 3'UTR sur des séquences préférentiellement riches en motifs répétés UG, bien que cette caractéristique ne soit pas indispensable à l'interaction. Ainsi, TDP-43 est capable d'interagir avec la région 3'UTR (*untranslated region*) de son propre ARNm afin de moduler sa capacité à être traduit (Ayala et al., 2011). Ce mécanisme d'autorégulation joue un rôle important en maintenant la quantité de TDP-43 présente dans la cellule à un niveau physiologique (Ayala et al., 2011).

b) Régulation des micro-ARN (miRNA)

Moins de 5% des ARN produits au sein des cellules codent pour des protéines. Les 95% restants – appelés ARN non codants (ncRNA) – sont aujourd’hui connus pour jouer un rôle essentiel dans la régulation de l’expression génique au sein du SNC, à la fois en conditions physiologiques et pathologiques (pour revue, (Nelson et Keller, 2007)). Les miRNA font partie de ces ncRNA et ont pour fonction de réprimer l’expression d’ARNm cibles en s’appariant directement aux séquences complémentaires de ces derniers (Fire et al., 1998). La synthèse des miRNA comporte plusieurs étapes entre le noyau et le cytoplasme et fait intervenir principalement deux RNase III appelées Drosha et Dicer. En effet, après la transcription du miRNA primaire (pri-miRNA), ce dernier est clivé par la protéine Drosha et conduit à la formation d’une séquence appelée pré-miRNA (Lee et al., 2003). Ce pré-miRNA est ensuite transporté dans le cytoplasme où il sera maturé par Dicer pour aboutir à un miRNA fonctionnel de 22 nucléotides (Cullen, 2004).

L’hypothèse que TDP-43 puisse participer à la régulation des miRNA fut émise de par sa présence au sein du complexe Drosha et de son association au niveau des fibrilles péri-chromatiniennes, où naissent les pri-miRNA (Casafont et al., 2009; Kawahara et Mieda-Sato, 2012). En accord avec cette première observation, des études ont mis en évidence une dérégulation de l’expression de plusieurs miRNA tel que let-7b, miR-663 ou miR-132 (Buratti et al., 2010; Freischmidt et al., 2013). La majorité de ces dérégulations résultent d’une interaction directe entre TDP-43 avec les miRNA ou leurs précurseurs. Cependant, lors de la différenciation neuronale *in vitro*, il a été montré que TDP-43 était capable de modifier la stabilité de Drosha, suggérant une potentielle incidence sur l’ensemble des miRNA (Di Carlo et al., 2013). De plus, une augmentation de l’expression de DICER a également été observée lors de la répression de TDP-43 dans un modèle de lignée cellulaire neuronale humaine (Colombrita et al., 2015). Ensemble, ces données confortent ainsi le rôle important de TDP-43 dans le métabolisme des miRNA (**Figure 15**).

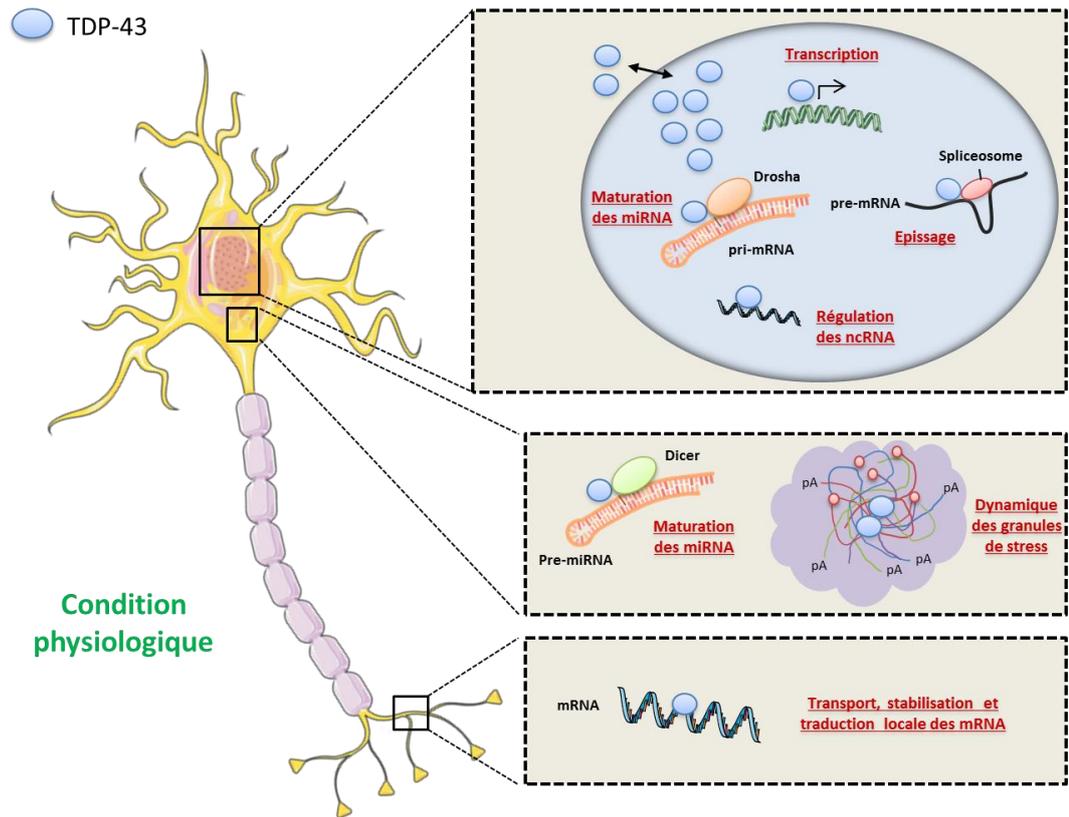


Figure 15 : Représentation schématique des principales fonctions de TDP-43 au sein des différents compartiments neuronaux. TDP-43 est localisée majoritairement dans le noyau et joue un rôle important dans le métabolisme des acides nucléiques en régulant la maturation des micro-RNA (miRNA), la transcription et l'épissage. TDP-43 modulerait également l'expression de plusieurs longs ARN non codants (ncRNA). Dans le cytoplasme, TDP-43 participe à la maturation des miRNA, à la formation des granules de stress, et régule le transport, la stabilisation et la traduction locale des ARN messagers (mRNA).

c) Régulation de l'expression des longs ARN non codants

Parmi les autres ncRNA, les longs ARN non codants (lncRNA) sont impliqués dans de nombreux mécanismes cellulaires, notamment au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. Récemment, une dérégulation de ces lncRNA a notamment été mise en évidence dans les pathologies liées au vieillissement, incluant les maladies neurodégénératives (Roberts et al., 2014). Dans ce contexte, TDP-43 a été montré comme affectant l'expression de plusieurs lncRNA tels que MALAT1 (associée aux domaines SC35 appelés *speckles*) et NEAT1_2 (impliqué dans la formation des *paraspeckles*) (Tollervey et al., 2011). En effet, dans le cerveau de patients FTLN/ALS, TDP-43 se fixe davantage à ces lncRNA et une augmentation de l'expression de NEAT 1_2 a été observée dans les motoneurons de patients ALS, en comparaison avec des individus sains (Nishimoto et al., 2013). Au regard de l'importance des *speckles* et des *paraspeckles* dans le métabolisme des ARN, une dérégulation de ces lncRNA pourrait contribuer à la physiopathologie des FTLN/ALS (pour revue, (Morimoto et Boerkoel, 2013)). Néanmoins, bien que l'interaction directe de TDP-43 avec ces lncRNA ait été établie, les mécanismes à l'origine de leur dérégulation et comment celle-ci contribue à la neurodégénérescence reste à déterminer (Lourenco et al., 2015).

2) Fonctions cytosoliques

Bien que TDP-43 soit principalement nucléaire, plusieurs fonctions dans le cytoplasme lui sont aussi attribuées, incluant la régulation de la stabilité des ARNm, leur transport ainsi que leur traduction (**Figure 15**).

a) Stabilisation des ARNm

TDP-43 fut tout d'abord identifié comme un régulateur de la stabilité des ARNm codant pour les neurofilaments léger (NF-L) et l'histone désacétylase HDAC6 (Fiesel et al., 2011; Strong et al., 2007). Rapidement, des études ont ensuite montré que les régions 3'UTR des ARNm – qui jouent un rôle crucial dans la stabilité des ARNm médiée par protéines liant l'ARN (appelées RBP pour *RNA binding protein*) – étaient une cible préférentielle de TDP-43 (Colombrita et al., 2012; Sephton et al., 2011). En conséquence, d'autres cibles de TDP-43 furent rapidement découvertes comme Add2 (Costessi et al., 2014), VEGFA, GRN (Colombrita et al., 2012) ou encore IL-6 (Lee et al., 2015).

b) Transport des ARNm

Au sein de cellules polarisées telles que les neurones, le transport des ARNm vers les axones et les dendrites est un processus fondamentale dans le maintien de l'activité neuronale et dans la plasticité synaptique (Liu-Yesucevitz et al., 2011). Plusieurs preuves suggèrent que TDP-43 participe à ce processus. Premièrement, une étude sur des cultures primaires de motoneurones a mis en évidence le transport de TDP-43 le long des axones. De manière intéressante, cette étude montrait également que TDP-43 était co-localisée avec les protéines SMN (pour *survival motor neuron protein*) et FRMP (pour *fragile-X mental retardation protein*), qui sont toutes deux connues pour jouer un rôle dans le transport des ARNm au sein de structures spécifiques, appelées granules d'ARNm (Fallini et al., 2012). Le transport de granules d'ARNm TDP-43 positives le long des axones fut ensuite confirmé dans des motoneurones dérivées de cellules souches pluripotentes inductibles humaines (iPSC) (Alami et al., 2014). Parmi les ARNm présents au sein de ces granules, l'ARNm de NF-L – dont la stabilité est régulée par TDP-43 – fut notamment mis en évidence. De plus, la présence de mutations de TDP-43 au sein de ces iPSC induit une altération du transport antérograde des granules, indiquant un rôle direct de TDP-43 dans le transport axonal des ARNm (Alami et al., 2014). Finalement, TDP-43 a aussi été retrouvée liée à des ARNm codant pour des protéines liées à la fonction synaptique dans le cerveau de souris adulte (Narayanan et al., 2012). Ces données, associées à la localisation de TDP-43 au niveau des terminaisons axonales, indiquent donc que TDP-43 joue un rôle dans le transport des ARN vers les prolongements neuritiques (**Figure 15**).

c) Régulation de la traduction des ARNm

Une des fonctions émergente de TDP-43, en lien direct avec son rôle dans le transport des ARNm vers les régions distales, est la régulation de la traduction locale des ARNm (**Figure 15**). La première preuve de son implication fut mise en évidence en 2008, lorsqu'une équipe observa une translocation de TDP-43 au niveau des dendrites après stimulation au chlorure de potassium, au sein de neurones hippocampiques de rat (Wang et al., 2008). Par ailleurs, cette même étude indiqua que TDP-43 était capable de réprimer la traduction d'ARNm au sein de granules d'ARNm, en partenariat avec d'autres RBP comme Staufen et FMRP (Wang et al., 2008). Des analyses protéomiques vinrent confirmer ces résultats en révélant l'interaction entre TDP-43 et la machinerie traductionnelle (Freibaum et al., 2010). De manière intéressante, une étude utilisant des cultures cellulaires soumises à un stress

oxydatif mit également en évidence la présence de TDP-43 au sein de polysomes enrichis en ribosomes inactifs (Higashi et al., 2013). Plus récemment, l'utilisation d'un modèle ALS chez la drosophile a décrit une régulation de la traduction des protéines Futsh/Map1b et Rac1 par TDP-43 (Coyne et al., 2014; Majumder et al., 2012). Ces protéines sont impliquées dans le fonctionnement neuronal, en modulant respectivement la formation des dendrites et l'architecture des jonctions neuromusculaires. Leur dérégulation pourrait donc jouer un rôle crucial dans la physiopathologie des FTLTDP. Enfin, l'étude du profil traductionnel dans des modèles murins d'ALS indique aussi une dérégulation de deux ARNm fixés par TDP-43 au niveau des motoneurons, codant respectivement pour les protéines DDX58 et MTHFS (Macnair et al., 2016).

II. *Physiopathologie de TDP-43*

Les formes agrégées de TDP-43 présentent un certain nombre de modifications anormales comme une hyperphosphorylation, une ubiquitinylation et une protéolyse de la région N-terminale (pour revue, (Lee et al., 2012)). Au niveau histopathologique, les lésions observées sont principalement de type cytoplasmique (NCI) et neuritique (DN, pour *dystrophic neurites*) et présentent une immunoréactivité pour TDP-43 ainsi que pour p62, une protéine liée à l'autophagie. Dans certains cas, généralement héréditaires, des inclusions neuronales intranucléaires (NII, pour *neuronal intranuclear inclusion*) sont aussi présentes. De plus, d'autres types de lésions qui ne sont pas ubiquitine-positives ont également été mises en évidence. Parmi elles, sont distingués des marquages cytoplasmiques diffus (appelés pré-inclusions), des marquages neuritiques vaporeux ainsi que des inclusions cytoplasmiques au sein des oligodendrocytes (GCI, pour *glial cytoplasmic inclusion*) (Mackenzie et Neumann, 2016). Concernant la répartition des lésions, elles sont communément retrouvées au niveau du cortex frontal et temporal ainsi que dans le gyrus denté de l'hippocampe. Cependant, de nombreuses autres régions sous-corticales peuvent aussi être affectées (Josephs et al., 2009). En fonction de la distribution des inclusions au sein des couches corticales ainsi que de la nature des inclusions, quatre sous-types histopathologiques sont définis. Nous verrons par la suite que chacun de ces sous-types peut être en partie corrélé à un syndrome clinique ou à une mutation génétique spécifique (Mackenzie et Neumann, 2016).

A. Les différents sous-types histopathologiques de FTLD-TDP

1) FTLD-TDP Type A

Les FTLD-TDP de type A se distinguent par la présence de nombreuses DN et NCI au niveau de la 2e couche du néocortex (Mackenzie et al., 2011) (**Figure 16**). Un nombre modéré d'inclusions granulaires NCI est également présent au sein du gyrus denté. De plus, des GCI sont retrouvées au niveau de la substance blanche et des régions sous-corticales telles que le striatum, le thalamus et la substance noire. Au niveau clinique, les cas atteints par ce type de pathologie TDP-43 présentent généralement une bvFTD ou un nfvPPA.

2) FTLD-TDP Type B

Les cas affichant une FTLD-TDP de type B montrent des lésions NCI dans les couches corticales externes et profondes avec relativement peu de DN ou de NII (Mackenzie et al., 2011). Les analyses immunohistologiques révèlent également un nombre important de pré-inclusions et de neurites vaporeux, principalement dans la couche superficielle du cortex (**Figure 16**). La présence de lésions NCI dans les motoneurones inférieurs est aussi une des spécificités du type B, et ce, même en l'absence de signes cliniques d'ALS. La glie est aussi affectée, avec un nombre important de GCI dans la substance blanche médullaire et dans la moelle épinière. La plupart des cas ayant un phénotype clinique de FTLD-ALS présente une FTLD-TDP de type B.

3) FTLD-TDP Type C

Les FTLD-TDP de type C sont caractérisées par la présence de longues lésions neuritiques, majoritairement dans la couche externe du cortex (Mackenzie et al., 2011) (**Figure 16**). Quelques lésions NCI peuvent être également retrouvées, à la fois dans le cortex et l'hippocampe. La présence de NII et GCI est en revanche très rare. Le type C constitue le sous-type pathologique le plus répandu chez les patients présentant une svPPA.

4) FTLD-TDP Type D

La signe distinctif du sous-type pathologique D est la présence d'abondantes lésions lentiformes NII et de courtes lésions neuritiques dans le néocortex en l'absence de NCI (Mackenzie et al., 2011) (**Figure 16**). Diverses régions sous-corticales (ganglion de la base, thalamus, hippocampe, cervelet...) peuvent aussi être affectées de manière hétérogène. Cette

présentation histopathologique est rare puisqu'elle n'est retrouvée que chez les cas portant une mutation sur le gène *VCP* (voir chapitre 5).

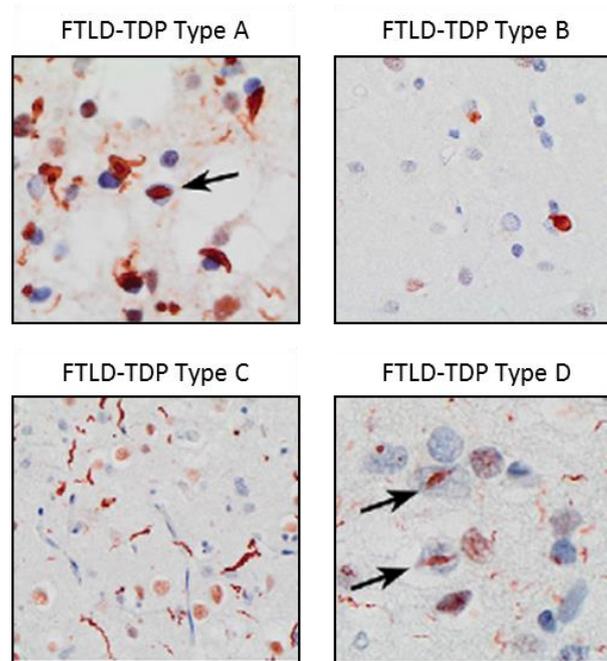


Figure 16 : Caractéristiques neuropathologiques des différents sous-types de FTLD-TDP. FTLD-TDP type A: petites lésions neuritiques, inclusions neuronales cytoplasmiques (NCI) et lésions neuronales intranucléaires lentiformes (NII, →) dans la couche II du cortex. FTLD-TDP type B: lésions NCI dans la couche profonde du cortex. FTLD-TDP type C : longs neurites dystrophiques (DN). FTLD-TDP type D: courts DN et NII (→). Adaptée de (Mackenzie et Neumann, 2016)

B. Physiopathologie de TDP-43

L'étiologie de la plupart des cas de FLTD et d'ALS est encore mal connue, cependant, ces cas sont reliés entre eux pas la présence de pathologie TDP-43 caractérisée par une délocalisation cytoplasmique, la présence de formes tronquées, une agrégation ainsi que des modifications post-traductionnelles de cette protéine. Cette partie se consacrera ainsi à comprendre ces mécanismes physiopathologiques impliquant TDP-43 et comment ils contribuent à la perte de fonction et/ou au gain de fonction toxique de cette protéine dans les FTLD-TDP.

1) Modifications post-traductionnelles

Dans le tissu cérébral des patients FTLD et ALS, l'hyperphosphorylation et l'ubiquitinylation de TDP-43 représentent une des caractéristiques principales de la pathologie. En effet, ces deux modifications marquent de façon préférentielle les formes clivées, agrégées et insolubles de TDP-43 (Hasegawa et al., 2008; Neumann et al., 2009a).

Les études immunohistologiques sur tissu humain indiquent que certaines lésions TDP-43, notamment les pré-inclusions, ne sont pas marquées positivement par l'ubiquitine (Strong et al., 2007). Ces résultats suggèrent ainsi que l'ubiquitinylation interviendrait de façon plus tardive dans le processus physiopathologique.

a) Phosphorylation

Il existe 64 sites potentiellement phosphorylables sur TDP-43, incluant 41 résidus sérine, 15 résidus thréonine, et 8 résidus tyrosine. Parmi ces sites, 29 ont été montrés comme étant phosphorylés par la protéine kinase CK1 (*casein kinase 1*) (Kametani et al., 2009). Expérimentalement, la caractérisation par western blot des tissus de patients FTLD et ALS soulignent que les sites pS379, pS403/404, et pS409/410 sont les plus caractéristiques de la pathologie TDP-43 (Hasegawa et al., 2008). En outre, le site pS409/410 représente le site de phosphorylation le plus étudié.

Les formes tronquées ou cytoplasmiques sont retrouvées phosphorylées dans un grand nombre de modèles cellulaires et animaux (Igaz et al., 2009; Nonaka et al., 2009; Winton et al., 2008). La surexpression de la forme sauvage de TDP-43 conduit à la formation d'agrégats constitués de protéines TDP-43 phosphorylées similaires à ceux observés chez les cas de FTLD ou d'ALS (Wegorzewska et al., 2009; Xu et al., 2010). Les formes phosphorylées de TDP-43 présentent une demi-vie plus longue en comparaison avec les formes non-phosphorylées, ce qui suggère que la phosphorylation pourrait inhiber la dégradation de TDP-43 médiée par le système UPS, et donc favoriser son agrégation (Zhang et al., 2010). Par ailleurs, la mutation des résidus sérine 409 et 410 en alanine, qui permet de mimer un état non-phosphorylé de la protéine, supprime la toxicité de TDP-43 lorsqu'elle celle-ci est surexprimée chez *caenorhabditis elegans*. De manière similaire, l'inhibition de protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de TDP-43, telles que CDC7 (pour *cell division cycle 7-related protein kinase*) ou TTBK (pour *tau tubulin kinase*) – réduit également la toxicité induite par la phosphorylation de TDP-43 (Liachko et al., 2013, 2014). En revanche, il existe aussi des preuves qui supportent un effet protecteur de la phosphorylation (Li et al., 2011).

Au final, la phosphorylation semble être un évènement relativement précoce dans la dans le développement de la pathologie TDP-43 (**Figure 17**). Cependant, bien que la phosphorylation soit étroitement liée à l'agrégation, il reste difficile d'établir si celle-ci est une cause ou une conséquence de l'agrégation. En effet, des études indiquent que la

phosphorylation de TDP-43 n'est pas indispensable au clivage, à l'agrégation ou à la toxicité induite par TDP-43 (Dormann et al., 2009; Iguchi et al., 2012). Ces résultats, associés au fait que la fonction physiologique de la phosphorylation TDP-43 reste encore indéterminée, rendent complexe l'utilisation d'outils thérapeutiques visant cette modification.

b) Ubiquitylation

L'ubiquitylation est une autre MPT affectant TDP-43. En effet, il a été montré que TDP-43 était modifiée par des chaînes de polyubiquitine liées en lysine 48 ou 63 (Hebron et al., 2013; Seyfried et al., 2010). De plus, la présence de formes ubiquitylées de TDP-43 (formes tronquées et formes entières) dans plusieurs modèles animaux et cellulaires suggère le système UPS comme principale voie de dégradation de TDP-43 (Wegorzewska et al., 2009; Winton et al., 2008). Le fait qu'une inhibition du protéasome favorise l'accumulation et l'agrégation de TDP-43 conforte cette hypothèse (Winton et al., 2008). TDP-43 présente une demi-vie assez longue comprise entre 12 et 34 heures dans la plupart des modèles cellulaires, alors que celle des fragments carboxy terminaux (CTF, *carboxy-terminal fragments*) est d'environ 4 heures (Pesiridis et al., 2011) (**Figure 17**). Cette différence peut notamment s'expliquer par une interaction différente avec l'UPS étant donné que les CTF ne disposent pas du NLS et sont donc localisés principalement dans le cytoplasme (Igaz et al., 2009). Au regard de leur labilité, l'accumulation des CTF est par conséquent assez surprenante et pourrait résulter d'une diminution de leur dégradation avec l'âge (Low, 2011).

Bien que l'ubiquitylation de TDP-43 ne soit pas aussi étudiée que la phosphorylation, plusieurs études s'y sont intéressées. Ainsi, l'ubiquitylation de TDP-43 par les ubiquitine ligases UBE2E (pour *ubiquitin-conjugating enzyme*) favorise le passage de TDP-43 vers un état insoluble mais ne promeut pas sa dégradation (Hans et al., 2014). À l'inverse, l'ubiquitylation médiée par Parkin induit une translocation de TDP-43 dans le compartiment cytosolique et peut contribuer à potentialiser sa dégradation (Hebron et al., 2013). De même, les tentatives pour favoriser la dégradation de TDP-43 en bloquant la libération des chaînes de polyubiquitine ont mené à des résultats hétérogènes. Ainsi, l'inhibition de la déubiquitinase USP14 dans des fibroblastes embryonnaires de souris favoriserait la clairance de TDP-43 en maintenant les chaînes d'ubiquitine (Lee et al., 2010). En revanche, la répression de l'expression de la déubiquitinase UBPY (pour *ubiquitin isopeptidase Y*) exacerbe la toxicité de TDP-43 chez la drosophile, et ce, malgré la rétention

des chaînes d'ubiquitine (Hans et al., 2014). Au regard des résultats contradictoires, le ciblage thérapeutique de l'ubiquitinylation demeure ainsi délicat.

c) Troncation

La présence de CTF de TDP-43 entre 20 et 25 kDa constitue une des signatures biochimiques des FTLTDP (Igaz et al., 2008; Neumann et al., 2006). La protéolyse de TDP-43 est un évènement favorisé par plusieurs mécanismes, incluant les mutations de TDP-43 dans sa région C-terminale (voir Chapitre 5, *TARDBP*) (Sreedharan et al., 2008), le stress cellulaire (Dormann et al., 2009; Zhang et al., 2007) et l'inhibition du protéasome (Huang et al., 2014). Du fait de l'absence de NLS sur les fragments générés, ces derniers s'accumulent dans le cytoplasme et agissent comme des facteurs pro-agrégatifs grâce à la présence du domaine de type prion (Fuentealba et al., 2010) (**Figure 17**). Ces CTF pourraient ainsi servir de base à la formation des inclusions en séquestrant la protéine TDP-43 entière (Nonaka et al., 2009; Yang et al., 2010). Cependant, il n'existe actuellement aucune preuve que le clivage de TDP-43 module directement la toxicité de TDP-43, et il semble même avoir un effet protecteur dans certains cas (Suzuki et al., 2011). De plus, la toxicité de TDP-43 semble nécessiter une conservation de la capacité d'interaction avec les ARN, qui est absente chez les CTF (Voigt et al., 2010). En outre, une étude *in vitro* indique que la production de CTF *de novo* n'est pas suffisante pour induire une agrégation de TDP-43, et qu'un second évènement est nécessaire pour cela (Pesiridis et al., 2011). Finalement, il est important de souligner que la troncation de TDP-43 semble être un processus nécessaire à la dégradation de TDP-43 en condition physiologique (Huang et al., 2014). Ainsi, le blocage de la protéolyse de TDP-43 comme outil thérapeutique ne semble pas être la meilleure option.

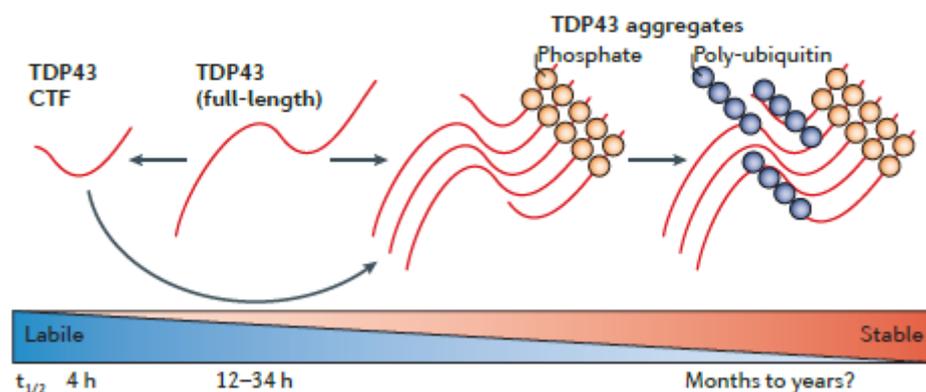


Figure 17 : Stabilité et renouvellement de TDP-43 en fonction des modifications post-traductionnelles. CTF, *carboxy-terminal fragments*. Issue de (Lee et al., 2012).

2) Délocalisation de TDP-43

La perte de localisation nucléaire associée à une agrégation dans le cytoplasme ou dans les neurites est un des signes distinctifs des FTLD-TDP (Neumann et al., 2006). Bien que la plupart des inclusions de TDP-43 soient extranucléaires, nous avons vu que certaines étaient situées dans le noyau (NII). TDP-43 est normalement localisée dans les régions euchromatiques du nucléoplasme, notamment dans les fibrilles péri-chromatiniennes, où des processus comme la transcription et l'épissage ont lieu (Casafont et al., 2009). Ainsi, même quand les inclusions sont nucléaires, TDP-43 est néanmoins considérée comme étant mal localisée.

La délocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme peut être modulée par plusieurs facteurs, incluant les mutations de *TARDBP* associées à l'ALS (Barmada et al., 2010), le stress cellulaire (Colombrita et al., 2009) ainsi que l'altération de la dégradation de TDP-43 (van Eersel et al., 2011). Plusieurs modèles cellulaires et animaux ont été développés afin d'évaluer comment la délocalisation de TDP-43 dans le cytoplasme contribuait à la neurodégénérescence. Pour cela, la forme de TDP-43 mutée sur le NLS a largement été utilisée afin d'induire une localisation de TDP-43 principalement cytoplasmique (Igaz et al., 2009; Winton et al., 2008). De manière intéressante, cette délocalisation s'accompagne d'une agrégation de la forme mutée qui est par ailleurs capable de recruter les protéines TDP-43 natives (Winton et al., 2008). Cependant, plusieurs études ont montré que la forme sauvage de TDP-43 était suffisante pour induire une toxicité, et ce, même en l'absence d'inclusions (Yamashita et al., 2014). Quoi qu'il s'en soit, diminuer la localisation cytoplasmique de TDP-43 semble réduire la toxicité *in vivo* (Kim et al., 2014; Wang et Mandelkow, 2012). Néanmoins, il faut souligner que ces études ne ciblent pas directement le transport nucléo-cytoplasmique de TDP-43, mais d'autres mécanismes tels que l'autophagie.

En conclusion, la question se pose de savoir si c'est la forme native ou mal conformée qui est responsable de la toxicité induite par TDP-43 dans le cytoplasme. En effet, cibler les formes toxiques de TDP-43 sans altérer le transport nucléo-cytoplasmique normal de TDP-43 sera indispensable au développement d'outils thérapeutiques visant ce mécanisme pathologique.

3) Agrégation

Les agrégats intraneuronaux de TDP-43 constituent la signature biochimique principale des FTLD-TDP. La présence d'agrégats protéiques est un phénomène retrouvé dans de nombreuses maladies neurodégénératives, cependant, le rôle protecteur ou délétère de ces inclusions est encore très débattu. En effet, au regard de la corrélation entre l'agrégation et l'ensemble des modifications pathologiques retrouvées (délocalisation, troncation, phosphorylation, ubiquitylation...), il est difficile de désigner l'agrégation comme le principal mécanisme physiopathologique. TDP-43 n'échappe pas à cette observation et de nombreuses études soulignent des rôles différentiels de l'agrégation de TDP-43 dans la pathologie. Ainsi, bien que les modèles animaux transgéniques exprimant la forme entière de TDP-43 affichent quelques inclusions de TDP-43, ces dernières sont relativement rares et ne sont pas corrélées au phénomène de neurodégénérescence (Igaz et al., 2011). En outre, prévenir la formation d'inclusions de TDP-43 ne semble pas réduire la toxicité dans un modèle cellulaire (Liu et al., 2013). Néanmoins, il est important de souligner ces études se basent sur la présence d'agrégats visibles de TDP-43. Or, il est possible que ces agrégats soient uniquement l'étape finale d'un processus mettant en jeu différentes espèces de TDP-43 allant du simple monomère aux agrégats matures, en passant par les oligomères. Cette hypothèse est supportée par de récentes études indiquant que la forme entière de TDP-43 est capable de former des structures oligomériques ayant des propriétés amyloïdes. Ces oligomères sont retrouvés à la fois dans le cerveau de patient FTLD-TDP et de souris transgéniques et seraient capables d'induire l'agrégation d'autres peptides amyloïdes, tels que l'A β (Fang et al., 2014).

4) TDP-43, une protéine prion ?

La propagation de TDP-43 représente un mécanisme émergent dans la physiopathologie des FTLD-TDP. Cette hypothèse repose notamment sur la présence d'un domaine de type prion dans la partie C-terminale de TDP-43 (Fuatealba et al., 2010) (**Figure 14**) mais également sur le fait qu'il existerait une progression hiérarchisée de la pathologie dans les FTLD-TDP (Brettschneider et al., 2014) (**Figure 18**). Néanmoins, celle-ci est moins bien déterminée que pour Tau dans la MA, et aucune corrélation entre la progression de la pathologie TDP-43 et la durée d'évolution de la maladie n'a pu être établie.

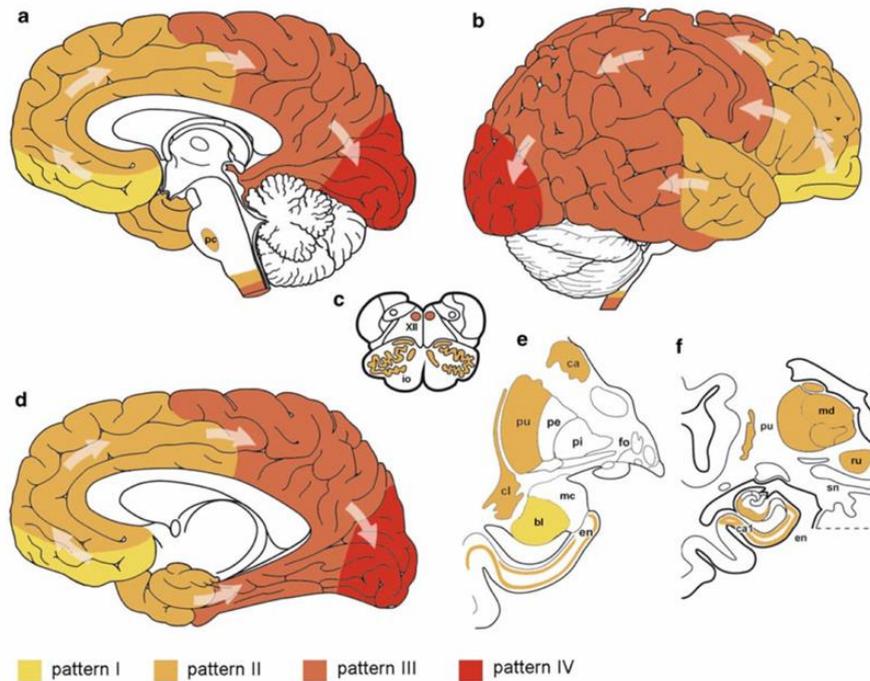


Figure 18 : Progression séquentielle de la pathologie TDP-43 dans les FTLD-TDP. *a* *pc* precerebellar; *nuclei*; *c* *XII* hypoglossal nucleus, *io* inferior olive; *e* *ca* caudate nucleus, *pu* putamen, *pi* internal pallidum, *pe* external pallidum, *fo* fornix, *cl* claustrum, *mc* mediocentral subnuclei of the *bl* basolateral subnuclei of amygdala, *en* entorhinal cortex (*en*); *f* *pu* putamen, *md* mediodorsal thalamus, *rn* red nucleus, *sn* substantia nigra (*sn*), *ca1* Ammon's horn region 1, *en* entorhinal cortex. Issue de (Brettschneider et al., 2014).

Le rôle pro-agrégatif de ce domaine de type prion est notamment supporté par deux faits. D'une part, la plupart des mutations de TDP-43 retrouvées dans l'ALS ciblent la partie C-terminale (**Figure 25**). D'autre part, les CTF, qui contiennent essentiellement ce domaine prion, semblent favoriser l'agrégation *in vivo* et *in cellulo* (Nonaka et al., 2009). Bien qu'il n'existe actuellement pas de preuve *in vivo*, plusieurs études suggèrent que TDP-43 est capable de se propager et d'induire l'agrégation de protéines TDP-43 natives. Tout d'abord, des agrégats de TDP-43 recombinantes, préalablement formés *in vitro*, sont capables d'induire l'agrégation des protéines TDP-43 endogènes au sein de cellules HEK293T (Furukawa et al., 2011). De manière similaire, l'ajout de protéines TDP-43 insolubles provenant de cerveaux ALS/FTLD au sein de SH-SY5Y induit la formation d'agrégats constitués de TDP-43 endogènes ubiquitinylées et phosphorylées (Nonaka et al., 2013). De plus, une étude a récemment montré que des oligomères de TDP-43 pouvait se propager de cellule en cellule par l'intermédiaire d'exosomes ou de microvésicules (Feiler et al., 2015). Ces résultats suggèrent ainsi que les propriétés prion attribuées à TDP-43 pourraient jouer un rôle dans la physiopathologie des FTLD, néanmoins, ils devront être confirmés *in vivo*.

Chapitre 5 : Génétique des FTLD-TDP

I. *GRN*

Les premières mutations sur le gène *GRN* furent mises en évidence en 2006 (Baker et al., 2006a; Cruts et al., 2006). Aujourd'hui, 82 mutations pathologiques sur le gène de la progranuline ont été recensées (<http://www.molgen.vib-ua.be/FTDMutations>) (**Figure 19**), avec un nombre de cas représentant 5 à 20% des FTLD d'origine familiale. La plupart des mutations affectant le gène *GRN* sont de type non-sens et conduisent à une réduction de l'expression du gène, suggérant l'haploinsuffisance comme principal mécanisme pathologique. En effet, les porteurs de ces mutations présentent une réduction de 50% de la quantité d'ARNm et d'environ 33% de celle des protéines (Baker et al., 2006a).

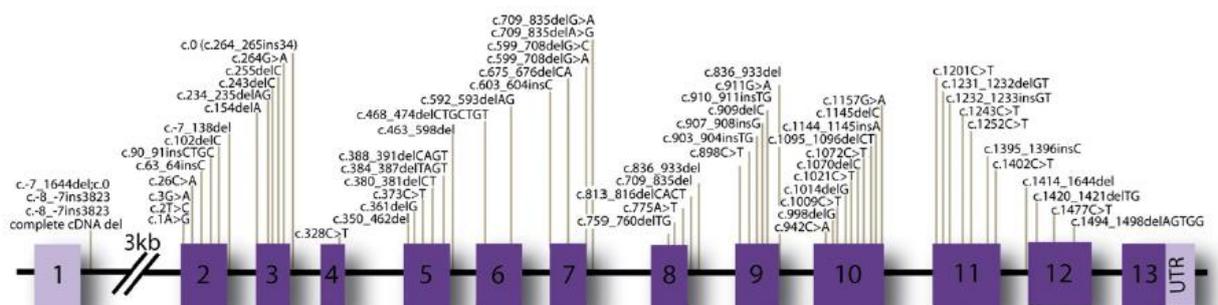


Figure 19 : Représentation schématique du gène de la progranuline et de la majorité des mutations pathologiques associées au FTLD-TDP. Les mutations sont numérotées en rapport avec le transcrypt le plus long (NM_002087.2). 70 mutations sont représentées ici. Adaptée de (Gass et al., 2012a)

A. Structure et expression de la progranuline

1) Structure

Comme *MAPT*, le gène de la progranuline *GRN* est localisé sur le chromosome 17 en position q21. Ce gène code une protéine de 68,5 kDa composée de 593 acides aminés riches en cystéine. La forme entière de la protéine contient 7,5 domaines bien conservés, consistant chacun en une répétition de 12 motifs cystéine (appelé aussi motif granuline) séparés par des régions de liaison (Bhetari et al. 1993) (**Figure 20**). Une fois dans le milieu extracellulaire, différentes protéases vont pouvoir cliver la progranuline au niveau de ces régions pour générer des fragments allant de 6 à 25 kDa, appelés granulines (Bateman et al., 1990).

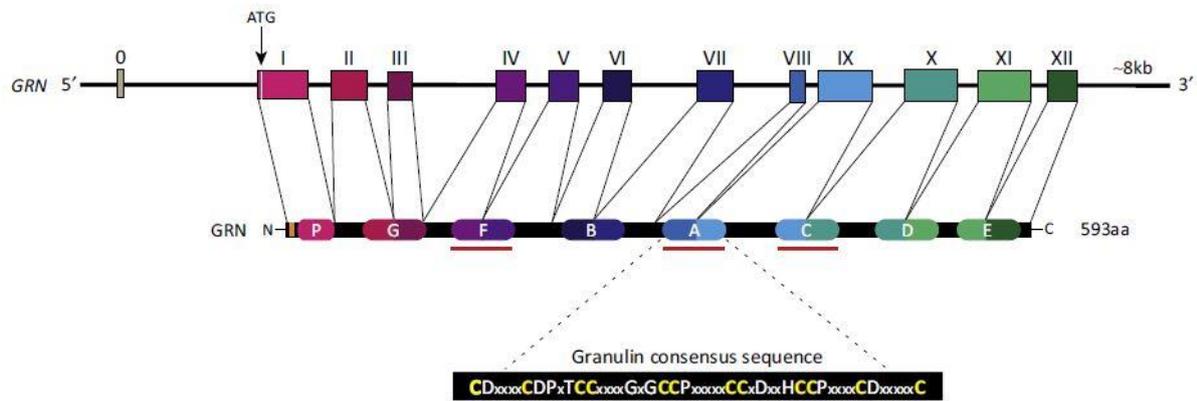


Figure 20: Représentation schématique du gène *GRN* et de sa protéine. Le gène *GRN* est localisé sur le chromosome 17 en position q21.32 et comprend 13 exons dont 12 sont codants. La protéine entière est constituée d'un peptide signal (en orange) suivi de 7,5 domaines granulaires. Ces domaines sont séparés par des régions de liaison contenant les séquences reconnues par les protéases extracellulaires. Les différentes granulines (6kDa) sont nommées par des lettres suivant l'ordre de leur découverte. Adaptée de (Petkau et Leavitt 2014a).

2) Expression dans le SNC

La progranuline est une protéine sécrétée qui est exprimée dans de nombreux tissus et types cellulaires à travers l'organisme. Au niveau du cerveau, son expression est faible lors des premières phases du développement et augmente avec l'âge (Petkau et al., 2010). Concernant sa distribution dans les différents types cellulaires, elle est principalement retrouvée au sein des neurones et de la microglie, bien qu'elle puisse être présente en faible quantité au niveau des astrocytes et des épendymocytes (Ahmed et al., 2010; Petkau et al., 2010). Enfin, plusieurs études indiquent que son expression au sein de la microglie est fortement augmentée en conditions pathologiques (Naphade et al., 2010; Philips et al., 2010).

3) Modulation de l'expression par *TMEM106B*

La pénétrance des mutations sur le gène *GRN* est incomplète, c'est pourquoi la compréhension des facteurs qui régulent l'expression de ce gène est importante d'un point de vue thérapeutique. Une étude génomique à grande échelle (GWAS, *genome-wide association study*) de cas FTLD-TDP a permis d'identifier le gène codant pour la protéine transmembranaire 106B (*TMEM106B*) comme un modulateur de la pathologie chez les patients portant une mutation sur le gène *GRN* ou non. La variabilité génétique de *TMEM106B* affecte notamment la pénétrance de la maladie chez les cas portant une mutation sur le gène de la *GRN* mais également l'âge de début des premiers symptômes (Finch et al., 2010). De plus, les individus portant l'allèle à risque affiche un niveau plasmatique de progranuline plus faible (Cruchaga et al., 2011).

Le gène *TMEM106B* code une protéine transmembranaire capable de s'associer avec la progranuline dans les endolysosomes (Lang et al., 2012). Concernant le mécanisme sous-jacent, une étude *in cellulo* indique que l'augmentation de l'expression de *TMEM106B* favorise l'augmentation intracellulaire de la progranuline (Chen-Plotkin et al., 2012). Cela passerait par une séquestration de la progranuline au sein des lysosomes, qui bloquerait par conséquent sa libération dans l'espace extracellulaire et/ou diminuerait sa dégradation.

B. Fonctions biologiques

La progranuline est impliquée dans une multitude de mécanismes physiologiques et pathologiques, incluant la prolifération cellulaire, l'inflammation et les maladies métaboliques. En revanche, son rôle au sein du cerveau reste encore largement méconnu, et ce, malgré d'intenses recherches à son sujet depuis la découverte de son implication dans les FTLN en 2006.

1) Fonctions neuronales

a) Croissance des prolongements neuronaux

Au regard de sa fonction comme facteur de croissance au niveau périphérique, de nombreuses études se sont intéressées au rôle potentiel de la progranuline dans la croissance et la survie neuronale. Tout d'abord, l'expression de la progranuline ou de la granuline (E) a été démontrée comme favorisant la survie des neurones et la croissance neuritique dans des cultures primaires neuronales de rat (Van Damme et al., 2008) (**Figure 21**). Par ailleurs, une étude chez le Zebrafish souligne un rôle important de la progranuline dans le développement des motoneurones (Chitramuthu et al., 2010). En outre, la répression de l'expression des homologues de la progranuline chez le Zebrafish induit une réduction de la croissance axonale (Laird et al., 2010). Au sein de cultures primaires de neurones murins, un traitement par la progranuline montre une augmentation de la croissance des prolongements neuronaux par l'intermédiaire de la glycogène synthase kinase-3beta ($GSK-3\beta$) (Gao et al., 2010). A l'inverse, l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre la progranuline diminue l'arborescence neuritique dans des cultures primaires de rat (Tapia et al., 2011). De plus, l'ajout de progranuline recombinante chez des souris *GRN* $-/-$ se révèle capable de rétablir la croissance des neurites (Gass et al., 2012b). Enfin, toujours dans un modèle murin déficient pour la progranuline, l'analyse de la taille des dendrites au niveau des cellules pyramidales de la CA1 soutient une nouvelle fois l'implication de la progranuline dans la

croissance des neurites (Petkau et al., 2012). Il est intéressant de souligner que, compte tenu de la faible expression de la progranuline lors du développement embryonnaire, son rôle dans la croissance neuritique est probablement davantage associée à la plasticité synaptique dans le cerveau adulte.

b) Plasticité synaptique

Plusieurs preuves suggèrent que la biologie synaptique peut être modulée par la progranuline. Ainsi, une augmentation du nombre de vésicules synaptiques et de leur probabilité de sécrétion a été observée dans des cultures de neurones hippocampiques de rat déficientes en progranuline. De manière intéressante, ces résultats ont été confirmés dans le cerveau de patients FTLD portant une mutation sur le gène *GRN* (Tapia et al., 2011). Bien qu'une autre étude indique l'inverse en soulignant une baisse du nombre de ces vésicules chez des souris *GRN* *-/-* (Petkau et al., 2012), l'ensemble de ces données soutient le rôle de la progranuline dans la fonction synaptique. En outre, une dérégulation de l'expression de miRNA ciblant des protéines impliquées dans la biologie synaptique a été mise en évidence chez des patients FTLD-TDP portant une mutation sur le gène *GRN* (Kocerha et al., 2011). Par ailleurs, une stimulation de l'activité neuronale favoriserait le recrutement de la progranuline au niveau synaptique mais également sa sécrétion synaptique et extra-synaptique (Petoukhov et al., 2013) (**Figure 21**). Enfin, un lien entre la perte de la progranuline et un dysfonctionnement synaptique a aussi été décrit récemment. Une étude a en effet montré une augmentation de l'élimination des synapses inhibitrices chez des souris dont l'expression de la progranuline a été réprimée dans la microglie. Ce phénomène serait notamment médié par une augmentation de l'expression du complément résultant d'une activation microgliale plus élevée chez ses souris (Lui et al., 2016) (**Figure 21**). Ces résultats représentent une avancée importante dans la compréhension des mécanismes de neurodégénérescence liés à la diminution de la progranuline dans les FTLD-TDP.

c) Autres fonctions

La progranuline est également capable de se fixer au récepteur de la Sortiline, connu pour lier des neuropeptides tels que la neurotensine et le facteur neurotrophique pro-NGF (pour *nerve growth factor*). Sa fixation au récepteur de la Sortiline provoque son endocytose et conduirait rapidement à sa dégradation par la voie lysosomale (**Figure 21**). Cependant, aucune voie de signalisation ne semble activée (Gass et al., 2012b), suggérant uniquement un rôle de la Sortiline dans la régulation de la concentration extracellulaire en progranuline (Hu

et al., 2010). Finalement, la progranuline serait aussi impliquée dans la réponse à différents stress où elle jouerait un rôle protecteur (pour revue, (Petkau et Leavitt, 2014b).

2) Fonctions microgliales

Du fait de sa surexpression en condition pathologique, plusieurs études se sont intéressées au rôle de la progranuline dans la microglie. Une étude a ainsi observé une sécrétion excessive de cytokines dans des cultures primaires dont l'expression microgliale de la progranuline est réprimée (Martens et al., 2012) (**Figure 21**). En outre, cet excès de cytokines se révèle cytotoxique. Une étude effectuée dans un modèle murin similaire a également montré une augmentation de la production du complément (Lui et al., 2016). A l'inverse, l'utilisation de siRNA dirigés contre la progranuline semble diminuer la production de cytokines, après stimulation au lipopolysaccharide, dans des cellules microgliales fœtales humaines (Suh et al., 2012). La progranuline semble également agir comme un chémo-attractant des cellules microgliales, suggérant un rôle dans le recrutement de ces cellules lors d'une atteinte du SNC (Pickford, 2011).

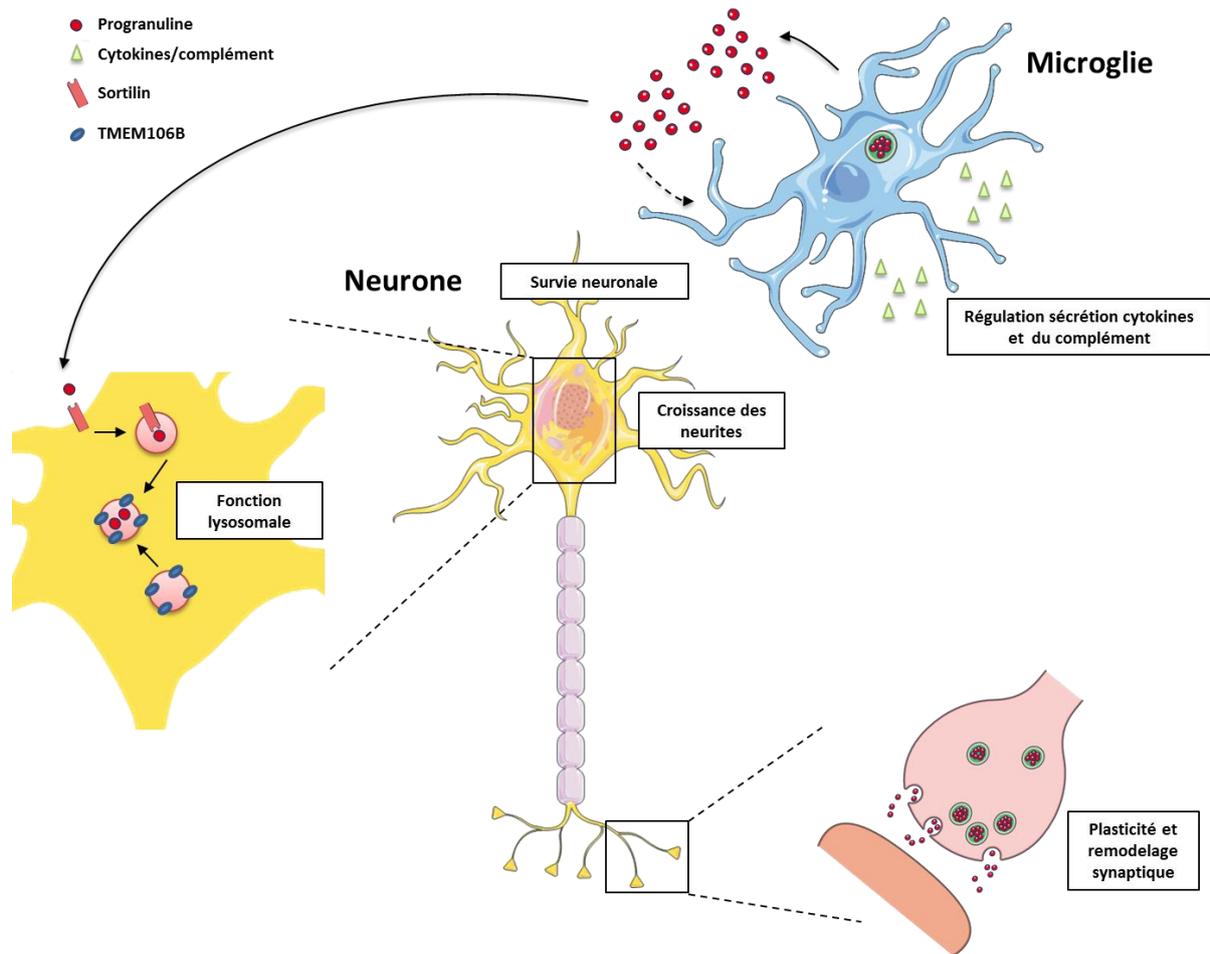


Figure 21 : Représentation schématique des fonctions potentielles de la progranuline au niveau du système nerveux central. Dans les neurones, la progranuline co-localise avec TMEM106B au sein des endosomes tardifs et des lysosomes précoces. Au niveau synaptique, la progranuline est sécrétée lors d’une stimulation neuronale et participe à la plasticité et au remodelage des synapses. La progranuline présente dans le milieu extracellulaire peut être endocytée par l’intermédiaire du récepteur à la Sortiline puis délivrée au lysosome afin d’être dégradée. La progranuline extracellulaire joue aussi un rôle important dans la survie et la croissance des neurites. Lors de l’activation, les cellules microgliales produisent davantage de progranuline. La progranuline est notamment impliquée dans la régulation de la sécrétion de cytokines et du complément. Adaptée de (Petkau et Leavitt 2014b).

C. Rôle de la progranuline dans la l’agrégation de TDP-43

Nous avons vu que la pathologie TDP était caractérisée par la présence de formes phosphorylées de la protéine TDP-43 entière ainsi que de fragments carboxy-terminaux dans le tissu cérébral des patients FTLN (Hasegawa et al., 2008; Neumann et al., 2006).

La relation entre l’haploinsuffisance en progranuline et le développement de cette pathologie reste encore méconnue. En effet, bien que plusieurs études *in vitro* observent une protéolyse et une agrégation de TDP-43 lors d’une déplétion en progranuline (Guo et al., 2010; Kleinberger et al., 2010; Zhang et al., 2007), ces résultats restent encore controversés

(Dormann et al., 2009). En outre, aucune modification pathologique de TDP-43 n'est retrouvée après une répression du gène de la progranuline chez le Zebrafish ou dans des lignées cellulaires humaines (Shankaran et al., 2008). De plus, les modèles murins déficients pour la progranuline montrent des phénotypes très variables. Ainsi, si certains modèles se distinguent par une phosphorylation et /ou une délocalisation de TDP-43 (Wils et al., 2012; Yin et al., 2010), d'autres ne présentent aucun signe de pathologie TDP-43, et ce, même à des âges avancés (Ghoshal et al., 2012; Petkau et al., 2012; Roberson et al., 2013). Néanmoins, une étude récente a démontré que certaines granules, notamment la granule (E), favoriserait la toxicité de TDP-43 dans différents modèles animaux. Une accumulation de ce fragment est également observée dans les régions cérébrales de patients affectées par la pathologie TDP-43 (Salazar et al., 2015).

D. Neuropathologie et signes cliniques associés

L'âge d'apparition des symptômes est plus tardif que pour les mutations *MAPT*, avec une moyenne entre 59 et 65 ans. Cependant, la durée d'évolution est similaire avec une moyenne de 9 ans. De manière singulière, il existe une hétérogénéité importante des symptômes cliniques observés chez les patients, et ce, même chez des individus présentant des mutations identiques ou appartenant à la même famille. La plupart des cas présentent des signes cliniques de bvFTD ou de svPPA qui sont souvent accompagnés d'un syndrome parkinsonien. En revanche, l'association avec une ALS n'est retrouvée que très rarement (Mackenzie, 2007).

La principale caractéristique observée en imagerie chez les patients portant une mutation de la *GRN* est la présence d'une atrophie asymétrique du cerveau (Whitwell et al., 2012). Des altérations de la substance blanche, une atrophie corticale sévère et une atteinte du lobe pariétal sont également retrouvés chez ces patients (Bozzali et al., 2013). D'un point de vue neuropathologique, des inclusions TDP-43 de type A sont majoritairement retrouvées. Les inclusions peuvent se présenter aussi sous forme de NII, et sont principalement localisées dans le cortex frontal et le striatum (Sieben et al., 2012). Des neurites dystrophiques dans les couches corticales superficielles ainsi que des petits neurites TDP-43 positifs dans la CA1 sont couramment rencontrés (Hatanpaa et al., 2008; Josephs et al., 2007). Par ailleurs, des études morphométriques indiquent que la pathologie TDP-43 affecte certains circuits neuronaux spécifiques chez les patients portant une mutation de la progranuline (Armstrong et Cairns, 2011). La distribution asymétrique des lésions TDP-43, principalement distribuées

dans l'hémisphère gauche, permet notamment de différencier la pathologie TDP-43 liée aux mutations de la *GRN* de celle parfois retrouvée chez les patients MA (Gliebus et al., 2010).

II. *C9ORF72*

A. Généralités

En 2011, deux équipes identifièrent une répétition hexanucléotidique GGGGCC dans une région non codante du gène *C9ORF72* comme la principale cause génétique commune de FTLD et d'ALS (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011) (**Figure 22**). En effet, bien que variable, la taille de l'expansion est d'environ 23 répétitions chez un individu sain alors qu'elle peut atteindre plusieurs milliers de répétitions chez les patients affectés (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Bien que le nombre exact de répétitions minimum pour induire la pathologie ne soit pas encore bien déterminé, la plupart des études considèrent la présence de plus de 30 répétitions comme pathologique (Woollacott et Mead, 2014). Aujourd'hui, respectivement 20% des 40% des cas familiaux d'ALS et de FTLD sont expliqués par une mutation de *C9ORF72* (Majounie et al., 2012). Au regard de l'implication importante de *C9ORF72* dans les FTLD et l'ALS, les recherches se sont intéressées à comprendre comment les répétitions GGGGCC conduisent au phénomène de neurodégénérescence.

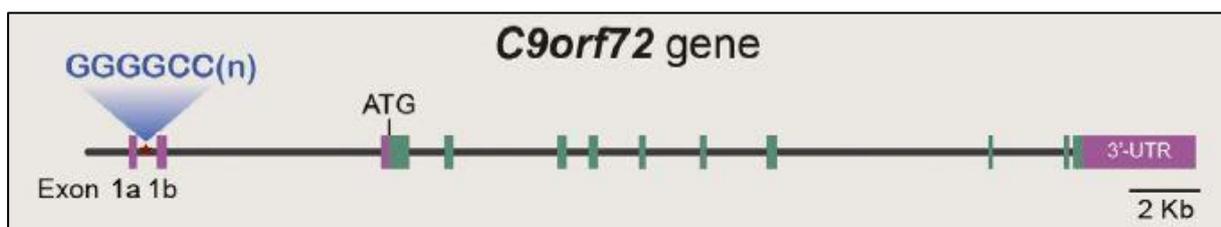


Figure 22 : Structure du gène *C9ORF72* et localisation des répétitions GGGGCC(n). Le gène *C9ORF72* présente des répétitions hexanucléotidiques (GGGGCC)_n dans l'intron 1. L'augmentation excessive de ces répétitions est une des causes génétiques majeures des FTLD et de l'ALS. Les fonctions de la protéine codée par le gène *C9ORF72* restent encore à déterminer. Adaptée de (Gitler et Tsuiji, 2016)

B. Mécanismes physiopathologiques liés aux répétitions GGGGCC

Trois hypothèses sont actuellement proposées pour expliquer le mode d'action pathologique des répétitions d'héxanucléotides. Premièrement, la présence de nombreuses répétitions pourrait causer une réduction de l'expression du gène *C9ORF72* conduisant à une perte de sa fonction physiologique (**Figure 23**). En effet, il semblerait que l'expression du gène *C9ORF72* soit réduite chez les patients portant ce type de mutation (DeJesus-Hernandez et al., 2011).

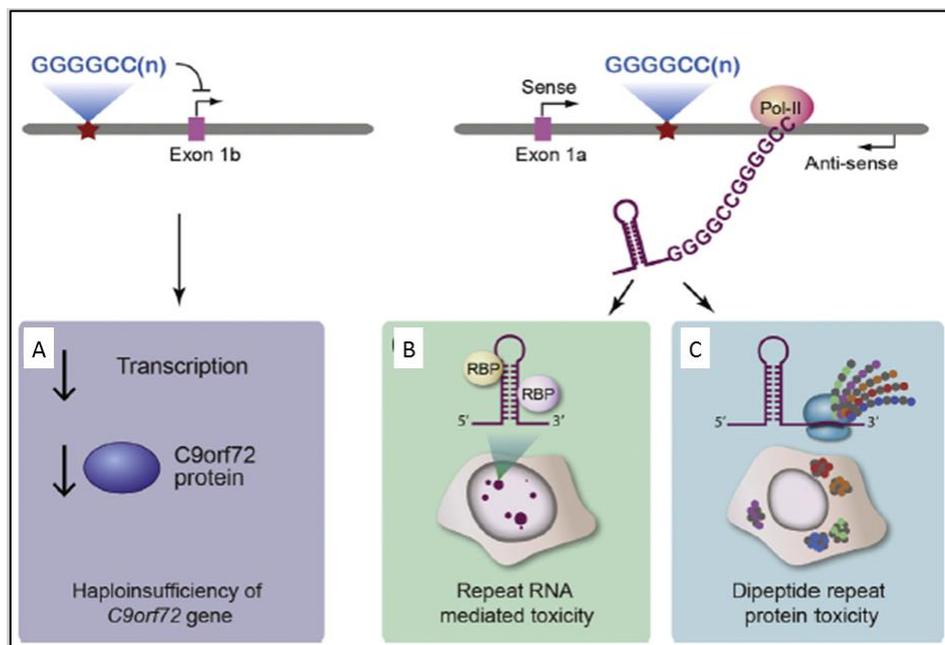


Figure 23 : Mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans les cas de FTL D *C9ORF72*. A. La présence de répétitions excessives GGGGCC pourrait réprimer l'expression du gène *C9ORF72* en interférant avec le mécanisme de transcription, conduisant à une réduction de la quantité de protéines codées par *C9ORF72*. B. Les transcrits sens et anti-sens issus des répétitions GGGGCC forment des foci d'ARN intraneuronales qui provoqueraient la séquestration de protéines impliquées dans le métabolisme des ARN, et donc une perte de leurs fonctions normales. C. Les dipeptides répétés, produits à partir des transcrits sens et anti-sens par un mécanisme de traduction non-ATG dépendant, s'accumulent dans le cerveau et la moelle épinière des patients *C9ORF72* et pourraient favoriser la neurodégénérescence. Adaptée de (Gitler et Tsuiji, 2016).

Deuxièmement, il a été montré que le tissu cérébral et la moelle épinière de patients FTL D/ALS se distinguaient pas la présence de foci nucléaires composés d'ARN GGGGCC mais également de l'ARN anti-sens GGCCCC (Gendron et al., 2013; Mori et al., 2013). De manière similaire au mécanisme décrit dans la dystrophie myotonique de type I (DM1) ((Caillet-Boudin et al., 2014) pour revue), ces foci pourraient séquestrer certaines RBP ou facteurs d'épissage et conduire à une perte de leurs fonctions physiologiques (**Figure 23**). Troisièmement, il a été mis en évidence que les transcrits (sens et anti-sens), produits à partir

des séquences répétées, seraient la cible d'un mécanisme de traduction non conventionnel ne dépendant pas de la présence d'un codon ATG. Ce mécanisme, appelé RAN (pour *repeat associated non-ATG-initiated translation*) serait responsable de la production d'une série de dipeptides (DPR, *dipeptide repeat*) (Glycine-Alanine (GA), Glycine-Proline (GP), Glycine-Arginine (GR), Proline-Alanine (PA) et Proline-Arginine (PR)) (Mori et al., 2013). Ces DPR, localisés à travers l'ensemble du SNC, ont la caractéristique d'être pro-agrégatifs et pourraient ainsi participer au processus neurodégénératif (Ash et al., 2013; Gendron et al., 2013; Mori et al., 2013). En effet, plusieurs études effectuées dans des modèles de cultures cellulaires ou chez la drosophile démontrent une toxicité de la part de ces DPR (Gendron et al., 2013; Zhang et al., 2016).

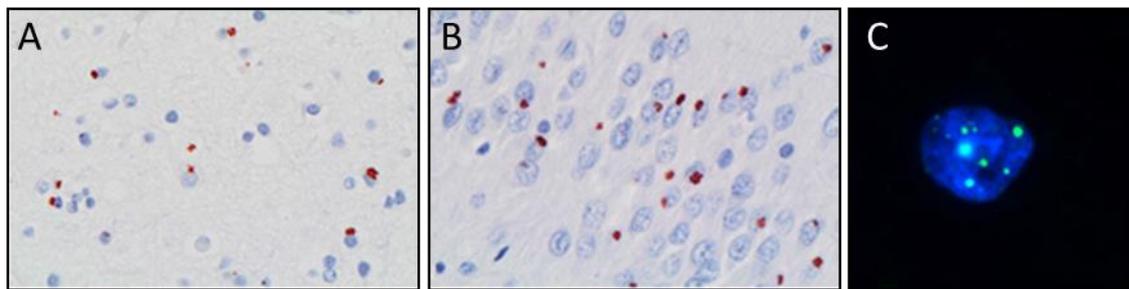


Figure 24 : Les foci d'ARN intranucléaires et les agrégats de dipeptides répétés cytoplasmiques sont caractéristiques des cas de FTLD associés à une expansion (GGGGCC)_n du gène *C9ORF72*. (A et B) Lésions NCI révélées à l'aide d'anticorps ciblant les dipeptides GA (A) ou GP (B). (C) Les foci d'ARN intranucléaires neuronaux sont détectés grâce à des sondes fluorescentes ciblant les répétitions (GGGGCC)_n. Adaptée de (Mori et al., 2013)

C. Présentation clinique et neuropathologie

Comme pour les mutations affectant le gène de la progranuline, il existe une certaine hétérogénéité clinique entre les membres d'une même famille. Ainsi, l'âge d'apparition des symptômes est extrêmement variable et s'étend de 21 à 83 ans avec une moyenne se situant à 50 ans (Hsiung et al., 2012; Majounie et al., 2012). De même que pour les mutations *GRN*, des variants du gène *TMEM106B* peuvent influencer sur l'apparition de la maladie chez les patients qui présentent une expansion sur le gène *C9ORF72* (Gallagher et al., 2014). Concernant la durée d'évolution de la maladie, elle se situe entre 1 et 22 ans avec une moyenne comprise entre 8 et 9 ans (Hsiung et al., 2012; Mahoney et al., 2012). Le phénotype le plus communément retrouvé chez les patients portant une mutation sur le gène *C9ORF72* est une bvFTD. Néanmoins, plusieurs autres symptômes, incluant une nvPPA, des déficits de mémoire ou des troubles moteurs extrapyramidaux peuvent aussi être observés (Hsiung et al., 2012).

D'un point de vue neuropathologique, les cas *C9ORF72* sont caractérisés par la présence d'inclusions TDP-43 à la fois dans le néocortex et dans les motoneurons inférieurs (Hsiung et al., 2012; Mackenzie et al., 2014). La pathologie au sein du tissu cérébral se présente principalement sous forme de FTLD de type B. Cependant, certains cas (généralement des patients âgés sans signe clinique d'ALS) montrent des traits correspondant davantage à une combinaison de FTLD de type A et B (Hsiung et al., 2012; Mackenzie et al., 2014). En parallèle de la pathologie TDP-43, les cas *C9ORF72* présentent une caractéristique unique correspondant à des lésions NCI et NII immuno-réactives pour des protéines du système UPS mais pas pour TDP-43. L'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre les DPR a permis de mettre en évidence leur présence au sein de ces inclusions TDP-43 négatives (**Figure 24**). La composition de ces lésions révèle que les DPR issus de la traduction des transcrits anti-sens GGCCCC (GA, GP et GR) sont ceux majoritairement retrouvés (Mackenzie et al., 2015). Ce type de lésion est présent dans l'ensemble du néocortex, dans le système limbique, le cortex cérébelleux mais aussi en plus faible proportion dans les ganglions de la base, le thalamus et le tronc cérébral supérieur. Contrairement aux symptômes cliniques, la distribution de la pathologie DPR est relativement similaire entre les différents cas *C9ORF72*. De manière surprenante, il n'existe actuellement aucune corrélation entre les DPR, la pathologie TDP-43 et la mort neuronale (Mackenzie et al., 2015). Ainsi, l'importance de la pathologie DPR en comparaison avec la pathologie TDP-43 dans le développement de la maladie reste encore sujette à débat. Enfin, les cas présentant une mutation de *C9ORF72* affichent aussi des foci d'ARN intraneuronaux composés de transcrits sens et anti-sens issus des répétitions GGCCCC (Mizielinska et al., 2013) (**Figure 24**). Ces foci sont présents dans 50% des noyaux neuronaux mais également de manière plus rare dans le cytoplasme et les cellules gliales.

III. *Autres gènes impliqués*

En dehors de *C9ORF72* et *GRN* qui représentent les principaux gènes impliqués dans les cas familiaux de FTLD-TDP, il existe plusieurs autres gènes jouant un rôle dans le développement de cette pathologie. Parmi eux, sont retrouvés notamment le gène codant pour TDP-43, *TARDBP* mais également *VCP*.

A. TARDBP

La majorité des mutations affectant le gène codant pour TDP-43 sont habituellement associées à des cas de MND (Kabashi et al., 2008). Des troubles cognitifs (bvFTD et svPPA) ont toutefois été décrits chez deux patients atteints de MND présentant une mutation sur le gène *TARDBP* (Benajiba et al., 2009). Cependant, aucune information concernant la neuropathologie n'a été rapportée. Néanmoins, une autre étude a décrit un cas portant la mutation K263E de *TARDBP* et développant une FTD, une PSP ainsi qu'une chorée. De plus, ces symptômes étaient corrélés avec la présence d'inclusions de TDP-43 au niveau du tronc cérébral et des noyaux sous-corticaux, à la fois dans les neurones et dans la glie (Kovacs et al., 2009). Les mécanismes physiopathologiques qui résultent de ces mutations du gène *TARDBP* restent encore à éclaircir. Toutefois, il est intéressant de noter que la plupart des mutations se situent sur la partie carboxy-terminale de TDP-43 et aboutissent à une délocalisation de la protéine dans le compartiment cytosolique (**Figure 25**). Ainsi, il est fortement probable que ces mutations conduisent à un gain de fonction toxique cytosolique ainsi qu'à une perte de fonction nucléaire. D'un point de vue histopathologique, les lésions présentent un profil particulier avec un mélange de NCI, NII et DN au niveau des régions sous-corticales alors que le cortex affiche principalement des lésions de type DN.

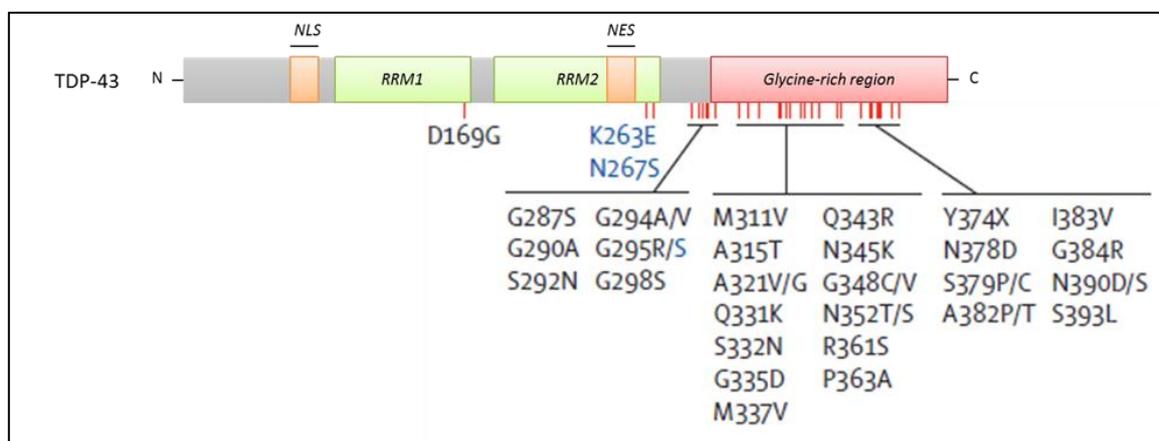


Figure 25 : Représentation de TDP-43 et d'une partie des mutations associées aux cas familiaux de FTLD et d'ALS. La plupart des mutations affecte la partie C-terminale de TDP-43. NLS, nuclear localisation signal ; NES, nuclear exportation signal ; RRM, RNA recognition motif.

B. VCP

Les mutations du gène *VCP* aboutissent à un syndrome rare appelé IBMFTD (maladie à corps d'inclusion associée à une démence frontotemporale et/ou à la maladie de Paget) qui affecte à la fois les muscles squelettiques, les os et le système nerveux. *VCP* appartient à la

famille des ATPase triple A et joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires liés à l'homéostasie des protéines. Elle favorise notamment l'adressage des protéines ubiquitinylées au protéasome ainsi que la dégradation des agrégats protéiques par l'autophagie. La mutation du gène *VCP* est en outre à l'origine d'une altération de la maturation des autophagosomes (Ju et Wehl, 2010). Les patients atteints de mutation *VCP* présentent une signature neuropathologique très particulière avec un nombre important de lésions de type NII et DN au niveau du cortex (FTLD-TDP Type D) (**Figure 16**) (Neumann et al., 2007).

C. Autres gènes

D'autres gènes seraient également associés au développement de la pathologie TDP-43, cependant, leur implication est moins claire que pour les gènes précédemment cités. Parmi eux, sont retrouvés ainsi les gènes codant pour le sequestosome 1 (Kovacs et al., 2016), l'ubiquiline 2 (Deng et al., 2011), TBK1 (pour *tank-binding kinase 1*) ou encore l'optineurine (Pottier et al., 2015a). Les données neuropathologiques concernant ces gènes ne sont actuellement pas suffisantes pour pouvoir établir des corrélations.

Chapitre 6 : Sous-classes minoritaires de FTLD et syndromes apparentés

Nous avons vu que dans la majorité des cas de FTLD, ce sont les protéines Tau ou TDP-43 qui se retrouvent agrégées. Cependant, dans 5 à 10% des cas restants, aucune de ces deux protéines n'est retrouvée lors de l'analyse neuropathologique. Dans la plupart de ces cas, ce sont des protéines de la famille FET (Fus, Ews et Taf15) qui sont agrégées au sein des neurones. Dans de très rare cas, seules des protéines liées au système UPS ont pu être identifiées (FTLD-UPS). Enfin, nous verrons que plusieurs autres maladies neurodégénératives peuvent également être présentées comme des FTLD.

I. *FTLD-FET*

En 2009, des mutations sur le gène *FUS* ont été découvertes chez des cas familiaux d'ALS (ALS-FUS) (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Au regard des signes cliniques confondants entre l'ALS et les FTLD, mais également des fonctions similaires entre FUS et TDP-43, l'hypothèse que FUS s'agrège dans les 5 à 10% de cas de FTLD ne présentant ni de lésions Tau ou TDP-43 fut émise. Grâce à l'utilisation d'outils immunologiques ciblant spécifiquement FUS, plusieurs études confirmèrent cette hypothèse. En effet, dans la majorité des cas de FTLD dépourvus de pathologie Tau ou TDP-43, incluant les cas de aFTLD-U (Neumann et al., 2009b), de NIFID (Kretzschmar et al., 2009) et les BIBD (pour *basophilic inclusions body disease*) (Munoz et al., 2009), la présence d'inclusions positives pour un marquage FUS est observée. Plus tard, des études révélèrent que ces lésions étaient également constituées des protéines EWS et TAF15 (Neumann et al., 2011) ainsi que de la transportine 1 (Trn1) qui est responsable du transport des protéines FET au sein du noyau (Brelstaff et al., 2011). Par conséquent, aussi bien les cas de aFTLD-U, la NIFID, la BIBD que ceux de FTLD caractérisés par des inclusions positives pour les protéines FET furent regroupés sous le terme de FTLD-FET (pour *FTLD with FUS, EWS and TAF15 inclusions*).

Les protéines FUS, EWS et TAF15 (appelées collectivement protéines de la famille FET) ont initialement été découvertes comme faisant parties d'oncogènes de fusion causant différents types de cancer spécifique à l'homme (pour revue, (Tan et Manley, 2009)). De manière similaire à TDP-43, ces protéines sont exprimées de façon ubiquitaire et font partie

des protéines se liant aux acides nucléiques. Ainsi, elles participent au métabolisme de ces derniers de multiples façons, incluant la régulation de la transcription, du transport des ARN, de la maturation des miRNA ainsi que de la réparation de l'ADN (Schwartz et al., 2014). Pour cela, elles disposent d'un domaine de reconnaissance aux ARN. Les protéines FET sont principalement localisées au niveau nucléaire mais se déplacent continuellement entre le noyau et le cytoplasme grâce à des signaux de localisation et d'exportation nucléaire. Les fonctions physiologiques des protéines FET dans le cerveau ne sont pas encore complètement connues mais les récentes études suggèrent un rôle important dans la régulation des ARN codant des facteurs impliqués dans la structure et la plasticité neuronale mais aussi dans le maintien de l'intégrité dendritique (Lagier-Tourenne et al., 2012).

Comme TDP-43, les cellules affichant des inclusions de protéines FET sont caractérisées par une perte partielle ou totale de ces protéines dans le compartiment nucléaire (Neumann et al., 2011). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette délocalisation. Tout d'abord, un dysfonctionnement de la protéine Trn1, résultant d'une variation génétique du gène *TNPO1* ou d'une modification post-traductionnelle, pourrait aboutir à une diminution de l'efficacité du transport des protéines FET dans le noyau (**Figure 26**). Cependant, l'absence d'autres protéines transportées par Trn1 au sein des agrégats, telles que hnRNPA1, rend cette hypothèse moins plausible (Neumann et al., 2011). D'autre part, des modifications post-traductionnelles, absentes en condition physiologique, peuvent également affecter les protéines FET elles-mêmes. De manière intéressante, une hypométhylation des résidus arginine dans une région proche du NLS des protéines FET est notamment observée. Celle-ci favoriserait l'affinité des protéines FET pour Trn1 et conduirait à la formation d'un complexe indissociable, favorisant ainsi la formation d'inclusions cytoplasmiques (Dormann et al., 2012) (**Figure 26**). Bien que la cause de cette hypométhylation reste encore à déterminer, cela explique pourquoi les agrégats présents dans les FTL-D-FET contiennent à la fois les protéines FET et Trn1.

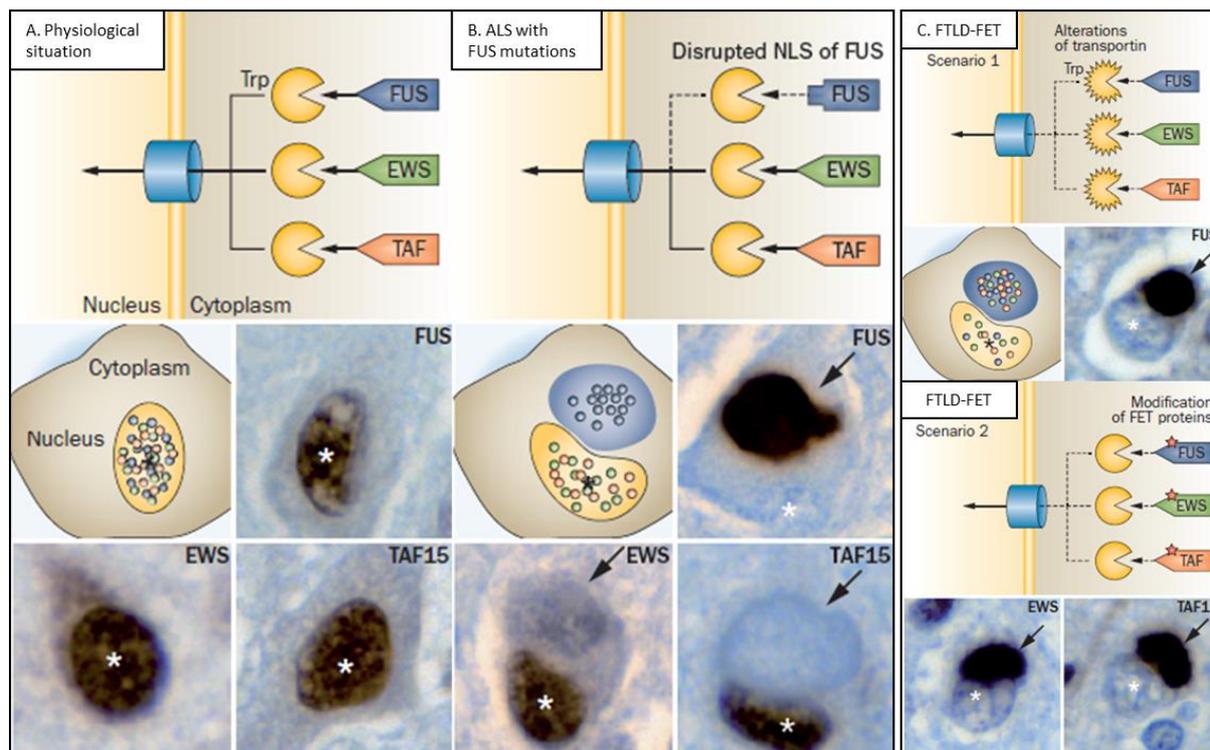


Figure 26 : Mécanismes physiopathologiques potentiellement impliqués dans les FTL-D-FET et ALS-FUS. Les protéines de la famille FET, FUS (bleue), EWS (verte), et TAF15 (rouge), disposent toutes d'un NLS (représenté ici par un triangle) qui est reconnu par Trn1 et permet leur transport dans le noyau. A. En condition physiologique, les protéines FET se lient normalement à Trn1, et sont principalement localisées dans le noyau. B. Dans les cas d'ALS-FUS, les mutations du NLS (représentée par un rectangle) altère l'interaction entre Trn1 et FUS, conduisant à sa délocalisation dans le cytoplasme. La localisation normale des autres protéines FET est en revanche conservée. C. L'accumulation cytoplasmique des protéines FET chez les patients FTL-D-FET peut résulter soit d'une altération de la protéine Trn1 (Scenari01) ou bien d'une modification post-traductionnelle des protéines FET (Scenari02). Les images d'immunohistochimie montrent chacune un neurone unique affichant une localisation nucléaire (astérisque) ou cytoplasmique (flèche) des protéines FET impliquées dans chacune des conditions (marquage marron). ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*; FTL-D, *frontotemporal lobar degeneration*; FUS, *fused in sarcoma*; NLS, *nuclear localization signal*; Trn1, *Transportine-1*. Adaptée de (Rademakers et al., 2012b).

A. Les sous-types de FTL-D-FET

1) aFTLD-U

Les aFTLD-U correspondent à un ensemble de FTL-D qui se distingue par une absence de pathologie TDP-43 ainsi que par des symptômes cliniques et des caractéristiques pathologiques « atypiques » (Mackenzie et al., 2008; Roeber et al., 2008). L'apparition d'une bvFTD est généralement précoce chez ces cas, avec une évolution rapide des troubles psycho-comportementaux sans atteinte du langage et des voies motrices.

Au niveau macroscopique, en plus de l'atrophie frontotemporale, la plupart des cas présentent une dégénérescence de la partie antérieure du striatum ainsi qu'une sclérose de

l'hippocampe (Mackenzie et al., 2008; Roeber et al., 2008). Les lésions se présentent sous forme de NCI, particulièrement petites et compactes, et sont immunoréactives pour les protéines FET, l'ubiquitine, et p62 (**Figure 27**). Concernant leur localisation, elles sont en majorité retrouvées dans le néocortex frontal et temporal, l'hippocampe et le striatum (MacKenzie et al., 2011; Neumann et al., 2009b). De manière surprenante, des lésions NII vermiformes sont également observées au sein du gyrus denté et des neurones pyramidaux du cortex (**Figure 27**). En comparaison avec les autres cas de FTLN-FET, les aFTLD-U présentent moins de pathologie dans les régions sous-corticales (MacKenzie et al., 2011).

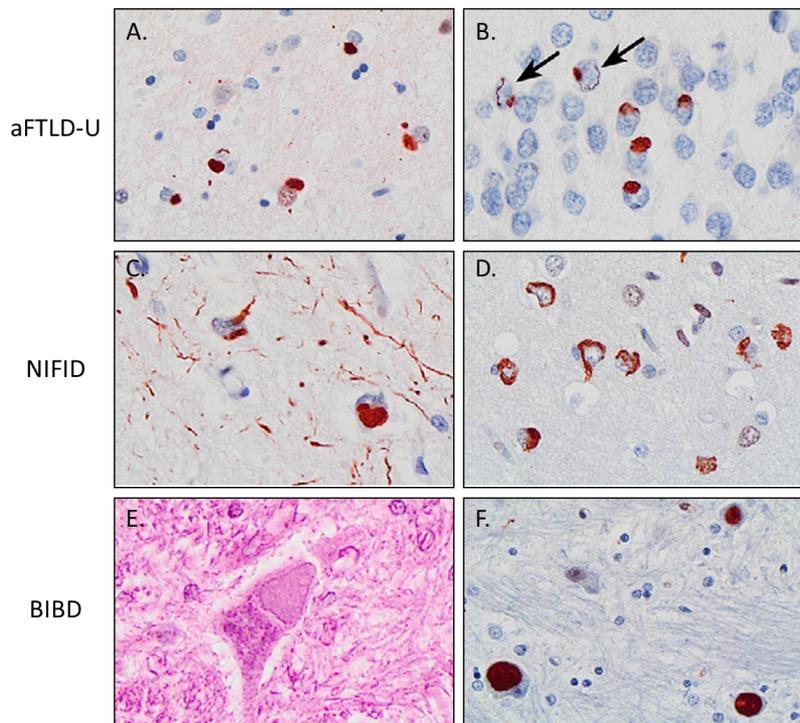


Figure 27 : Aspects microscopiques des FTLN-FET. Inclusions neuronales cytoplasmiques (NCI) compactes dans le néocortex (A) et inclusions neuronales intranucléaires (NII) vermiformes (B) dans les aFTLD-U. Le tissu cérébral des patients atteints de NIFID affichent des lésions NCI marquées positivement pour les filaments intermédiaires (C) ainsi que diverses morphologies de NCI (D). La BIBD est caractérisée par la présence de corps d'inclusions basophiles (E et F). aFTLD-U, *atypical frontotemporal lobar degeneration with ubiquitine-positive inclusions*; BIBD, *basophilic inclusion body disease*; NIFID, *neuronal intermediate filament inclusion disease*. Adaptées de (Mackenzie et Neumann, 2016).

2) NIFID

La NIFID est une maladie neurodégénérative peu commune qui présente des symptômes précoces de FTD associés à des troubles moteurs pyramidaux et extrapyramidaux (Cairns et al., 2004). Ces cas ont tout d'abord été distingués par leur signature neuropathologique unique qui inclut différents types de lésions NCI et NII immunoréactives

pour l'ensemble des neurofilaments intermédiaires (Cairns et al., 2004) (**Figure 27**). Par ailleurs, les cas de NIFID présentent une pathologie FET importante, incluant des inclusions de morphologie variée dans de nombreuses régions cérébrales (Kretzschmar et al., 2009; MacKenzie et al., 2011) (**Figure 27**). En effet, le cortex cérébral, l'hippocampe, les motoneurons inférieurs ainsi que plusieurs régions sous-corticales telles que les ganglions de la base et le tronc cérébral sont affectées. Des inclusions vermiformes de type NII, similaires à celles trouvées chez les cas d'aFLTD-U, sont aussi régulièrement observées mais uniquement dans l'hippocampe. De façon notable, les lésions IF sont toujours associées à une accumulation des protéines FET au sein de la même cellule. Cette particularité suggère ainsi que l'agrégation des protéines FET intervient avant celle des IF, et donc qu'elle joue un rôle central dans le processus physiopathologique chez les patients atteints de NIFID (Kretzschmar et al., 2009; Neumann et al., 2011).

3) BIBD

La BIBD est également hétérogène sur le plan clinique et neuropathologique. Les phénotypes affichent ainsi des présentations cliniques allant de l'ALS à la FTD, incluant des ALS avec démence associée (Munoz et al., 2009). La principale spécificité neuropathologique consiste en la présence d'inclusions de type NCI qui peuvent être marqués par des sondes basiques et apparaissent grises/bleues lors d'une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, d'où le terme d'inclusions basophiles (BI) (**Figure 27**). La morphologie de ces lésions est variable (ronde, ovale, en forme de croissant) et il est possible de les détecter par l'utilisation d'outils immunohistochimiques dirigés contre les ARN. Bien que les cas présentant une BIBD montrent une atrophie du cortex frontotemporal, les lésions BI sont généralement plus nombreuses dans les régions sous-corticales, comme les ganglions de la base et le *tegmentum* du tronc cérébral. En plus des lésions BI, des NCI composées de protéines FET sont retrouvées dans de nombreuses régions corticales et sous-corticales, à l'instar de celles présentes dans la NIFID (MacKenzie et al., 2011; Munoz et al., 2009). Néanmoins, la sévérité de la pathologie dans l'hippocampe et le striatum est plus variable et aucune NII n'est observée.

B. Influence de la génétique dans FTLD-FET

Parmi les protéines FET, FUS représente la protéine la plus impliquée dans les formes familiales. En effet, de nombreuses mutations faux-sens peuvent affecter la région C-terminale de FUS et sont responsables d'environ 4% des formes familiales d'ALS (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009). Ces mutations favorisent l'apparition de la pathologie en altérant le signal de localisation nucléaire de FUS. La réduction de l'interaction entre FUS et Trn1 qui résulte de ces mutations conduit ainsi à la formation d'inclusions de FUS dans le cytoplasme (Dormann et al., 2010) (**Figure 26**). Ainsi, les cas d'ALS-FUS sont caractérisés par des inclusions constituées de FUS, mais pas des autres protéines FET (MacKenzie et al., 2011). Des variations génétiques de TAF15 et EWS ont également été décrites chez certains patients ALS. Cependant, aucune pathologie associée n'a été décrite et il ne semble pas y avoir de conséquences sur le fonctionnement des protéines (Ticozzi et al., 2011).

Le rôle des mutations des gènes codant pour les protéines FET est très controversé. En effet, la majorité des cas de FTLD-FET sont sporadiques (Urwin et al., 2010). Bien que des mutations FUS ont été reportées chez quelques cas présentant des signes cliniques de FTD, ces derniers étaient généralement associés à une ALS et aucune confirmation autopsique n'a été apportée (Huey et al., 2012). L'analyse des gènes codant pour les N-arginine-méthyltransférases, impliquées dans la méthylation des protéines FET, n'a également pas révélé de mutation ou d'altération de leur expression (Ravenscroft et al., 2013).

1) FTLD-UPS

Malgré la découverte de TDP-43 et des protéines FET dans la majorité des cas de FTLD n'affichant pas de pathologie Tau, il reste encore un faible nombre de cas qui se distinguent uniquement par la présence d'inclusions immuno-réactives pour des protéines liées au système UPS (FTLD-UPS). Parmi ces cas, sont notamment retrouvés des cas héréditaires associés à une mutation du gène codant pour une protéine impliquée dans la formations des corps multi-vésiculaires, CHMP2B (Skibinski et al., 2005). La première mutation fut identifiée à l'origine dans une sous-population originaire du Danemark, néanmoins, des mutations ont ensuite été découvertes dans d'autres familles (<http://www.molgen.ua.ac.be/FTDmutations>).

Les patients affectés par une mutation de *CHMP2B* présentent des lésions granulaires de type NCI, en majorité au niveau des cellules granulaires du gyrus denté. Ces lésions sont marquées positivement pour l'ubiquitine et p62 en immunohistochimie mais négatives pour les protéines Tau, TDP-43 ou FUS (Holm et al., 2009). Cependant, si les FTLD-UPS résultent de l'accumulation d'une protéine encore non identifiée ou bien d'un dysfonctionnement du trafic lysosomal et endosomal plus général reste à éclaircir.

2) Autres pathologies de type FTLD

Il existe un certain nombre de troubles neurodégénératifs qui peuvent être assimilés à une FTLD, comme la leucoencéphalopathie héréditaire à sphéroïdes ou la maladie de Nasu-Hakola (Paloneva et al., 2000; Rademakers et al., 2011). De plus, une récente étude a décrit un syndrome similaire à la FTD dans une famille portant une mutation sur le gène codant pour la protéine PRKAR1B (pour, *protein kinase CAMP-dependent type I regulatory subunit beta*) (Wong et al., 2014). L'analyse neuropathologique met en évidence des lésions NCI uniques constituées de PRKAR1B et des différents neurofilaments, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un sous-type rare de NIFID sans pathologie FUS (Pottier et al., 2015b). En parallèle, plusieurs autres maladies neurodégénératives peuvent présenter une grande partie des critères diagnostiques associés à la bvFTD, appelées « variants frontaux ». Parmi ces variants, celui de la MA est le plus courant et pourrait représenter 17% des cas de FTD (Forman et al., 2006). Finalement, il reste également certains cas de FTLD ou aucune lésion n'a encore été détectée, et ce, malgré l'utilisation d'un large panel d'outils immunohistochimiques. Ces cas, anciennement appelés DLDH, sont aujourd'hui inscrits dans la classification comme FTLD-ni.

OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Objectifs

Aujourd'hui, le diagnostic des démences se fait du vivant du patient sur des critères cliniques et d'imagerie médicale. Il existe à l'heure actuelle un véritable problème de diagnostic différentiel des démences. Ainsi, le diagnostic définitif des démences repose sur l'examen neuropathologique du cerveau, la nature des lésions observées et leurs constituants moléculaires (Rabinovici et Miller, 2010). Dans cette introduction, nous avons vu que les FTLD constituaient un trouble neurodégénératif très complexe, que ce soit du point de vue clinique, génétique ou neuropathologique. Avec le développement des nouvelles techniques immunologiques ces dernières décennies, des avancées considérables ont été faites sur la compréhension de la base moléculaire de cette pathologie. La classification qui en découle, bien qu'en constante évolution, permet aujourd'hui d'établir avec plus de fiabilité le diagnostic, que ce soit du vivant du patient ou bien lors de l'examen neuropathologique.

Dans ce contexte, le laboratoire a établi une collaboration avec les départements de Neurologie (Centre de la Mémoire, Pr. F Pasquier, Pr. V Deramecourt), de Neuropathologie (Pr. CA Maurage, Pr. V Deramecourt) ainsi que la cérébrothèque du Centre de Ressources Biologiques (Lille Neurobank, Pr. CA Maurage, Pr. C Libersa, Pr. D Deplanque, Dr. P Gelé). Le but de celle-ci est de réaliser une analyse biochimique dans les cerveaux de patients atteints de FTLD la plus complète et informative possible en utilisant un éventail de sondes immunologiques. Un des buts de ces analyses biochimiques est de conforter le diagnostic établi en amont par les cliniciens, notamment lorsqu'un doute est émis. De manière intéressante, lors de ces analyses, le laboratoire a observé une perte variable mais significative des protéines Tau dans le cortex de patients atteints de FTLD-TDP. Ce résultat, particulièrement surprenant, fait écho à deux études publiées en 2001 et 2003 par Zhukerava et ses collègues. En effet, celles-ci décrivaient une perte partielle ou totale de l'expression des protéines Tau solubles, et ce, sans modification de la quantité d'ARNm (Zhukareva et al., 2001, 2003). A l'origine, cette réduction des protéines Tau fut identifiée dans le cerveau de patients DLDH, aujourd'hui connus sous le nom de FTLD-ni (Mackenzie et al., 2009). En 2006, grâce à l'utilisation de nouvelles techniques d'immunohistochimie, la plupart de ces cas ont été reclassés dans la catégorie des FTLD-U (Mackenzie et al., 2006). Cependant, aucune donnée ou information supplémentaire n'a été apportée sur cette réduction des protéines Tau depuis les études de Zhukareva. Avec les avancées de ces 10 dernières années dans la génétique et la neuropathologie des FTLD, la question de la pertinence de cette perte de Tau dans les FTLD reste donc encore à déterminer.

Objectifs

Afin de répondre à cette question, nous avons ainsi procédé à l'analyse par immunoempreinte de l'expression des protéines Tau dans le cerveau d'individus sains ou atteints de différentes maladies neurodégénératives incluant, la MA, les FTLD-Tau, FTLD-TDP-GRN, FTLD-TDP-C9ORF72, mais également des cas de FTLD-TDP et FTLD-FUS sporadiques. Afin d'augmenter le nombre de patients dans l'étude, nous avons également établi une collaboration avec I. Le Ber et C. Duyckaerts (Institut du Cerveau et de la Moelle, et cérébrothèque GIE NeuroCeb, Paris).

Au regard de la complexité des FTLD, plusieurs autres questions se posent également ! Quelles sont les différences ou similitudes moléculaires parmi ces FTLD? Comment ces inclusions composées de protéines différentes peuvent-elles aboutir à l'expression d'une seule maladie neurodégénérative mais complexe et hétérogène ? Pour tenter de répondre à ces questions, un projet en collaboration avec I. Le Ber et C. Duyckaerts (Institut du Cerveau et de la Moelle, et cérébrothèque GIE NeuroCeb, Paris) a été développé. En effet, afin de mieux comprendre ce qui distingue ces différentes entités, nous avons réalisé une étude protéomique différentielle du tissu cérébral des patients FTLD (FTLD-Tau, FTLD-TDP-GRN, FTLD-TDP-C9ORF72, FTLD-TDP sporadiques ou FTLD-FUS sporadiques) par rapport à des sujets sains. Cette approche de protéomique, que nous avons adaptée et optimisée pour l'analyse du tissu cérébral humain, consiste à analyser par électrophorèse bidimensionnelle différentielle en fluorescence (2D-DIGE) des échantillons protéiques de cerveaux obtenus de la Neurobank, Lille et du GIE NeuroCEB (Hop. Pitié-Salpêtrière – Pr. C. Duyckaerts). En parallèle, l'équipe d'I. Le Ber a réalisé une étude de RNAseq sur les mêmes sujets inclus pour l'étude protéomique, Cette dernière permettra notamment d'identifier des différences au niveau transcriptomique, incluant des polymorphismes nucléotidiques, des modifications d'expression ou encore d'épissage.

Ainsi, les données protéomiques seront croisées avec les données de RNAseq afin d'identifier les voies métaboliques modifiées dans les FTLD qui seront autant de cibles diagnostiques et/ou thérapeutiques.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

I. *Tissu cérébral humain*

Les échantillons cérébraux de patients atteints de dégénérescence lobaire frontotemporale, de la maladie d'Alzheimer et d'individus sains proviennent de la collection Lille NeuroBank du Centre de Ressources Biologiques du CHRU de LILLE ainsi que du GIE Neuro-CEB de Paris. Ces banques remplissent les critères législatifs sur les ressources biologiques incluant un comité d'éthique médical et la protection des données (article L1243-4 du Code de la Santé publique, Août 2007). Il s'agit d'échantillons de cortex frontal dont l'examen neuropathologique a été réalisé au département d'anatomo-pathologie du CHRU de Lille et de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière par les Pr. Vincent DERMAECOURT et Charles DUYCKAERTS. Les cas ainsi que les données neuropathologiques et démographiques associées sont répertoriés ci-dessous (**Tableau 2**).

Matériels

Diagnostic	Cas	Neuropathologie	Age (années)	Sexe	DPM (hr)	RIN (u.a)	Poids hémicerveau fixé (g)	Mutations
Témoin	1		73	M	10	6,6	508	
	2		84	M	15,5	5,3	N/A	
	3		70	M	31	5,6	765	
	4		76	F	28	4,8	580	
	5		86	F	N/A	5,1	540	
	6		79	M	N/A	6,3	675	
	7		69	M	6	6,9	632	
	8		60	F	28	6,8	788	
FTLD, sporadique	9	FTLD-TDP Type A	84	M	25	4,4	614	
	10	FTLD-TDP Type A	42	M	37	5,7	684	
	11	FTLD-TDP Type C	86	M	44	4,8	504	
	12	FTLD-TDP	67	F	22	6,3	495	
	13	FTLD-TDP Type C	68	M	N/A	2,5	430	
	14	FTLD-TDP Type C	72	M	16	5,8	452	
	15	FTLD-TDP Type B	53	M	5	8	600	
	16	FTLD-TDP Type B	77	M	17	5,5	378	
	17	FTLD-FUS	35	M	64	5,5	N/A	
	18	FTLD-FUS	59	M	30	6,6	430	
	19	FTLD-FUS	44	M	11	5,7	504	
	20	FTLD-FUS	35	F	17	5,9	495	
	21	FTLD-FUS	54	M	18	4,8	424	
FTLD, <i>GRN</i>	22	FTLD-TDP Type A	71	M	23	3	556	c.813_816del
	23	FTLD-TDP Type A	69	F	39	3,8	370	c.1494_1498del
	24	FTLD-TDP Type A	60	F	N/A	3,7	200	c.1494_1498del
	25	FTLD-TDP Type A	65	F	N/A	5,9	N/A	c.619dup
	26	FTLD-TDP Type A	67	M	22	3,4	608	c.813_816del
	27	FTLD-TDP Type A	69	M	18,5	7	166	c.1494_1498del
	28	FTLD-TDP Type A	78	F	20	4	420	N/A
	29	FTLD-TDP Type A	75	M	21	5,3	419	c.1157G>A
	30	FTLD-TDP Type A	73	M	10	5,6	456	Complete deletion
	31	FTLD-TDP Type A	86	F	5,5	6,8	388	Complete deletion
	FTLD, <i>C9ORF72</i>	32	FTLD-TDP	59	M	51	6,4	N/A
33		FTLD-TDP Type B	42	M	10	3,2	N/A	
34		FTLD-TDP Type B	40	F	48	4,5	N/A	
35		FTLD-TDP Type B	63	M	13	5,2	762	
36		FTLD-TDP	90	M	40	4,4	N/A	
37		FTLD-TDP	62	M	N/A	5,1	541	
38		FTLD-TDP Type B	69	M	8,5	4,4	N/A	
39		FTLD-TDP Type B	65	M	20	5,3	400	
40		FTLD-TDP Type B	62	F	5,5	7,6	258	
41		FTLD-TDP Type B	59	M	8,5	6	438	
FTLD-Tau, <i>MAPT</i>		42	FTLD-Tau	48	F	44,5	6,1	N/A
	43	FTLD-Tau	54	F	N/A	7,8	N/A	S305S
	44	FTLD-Tau	43	M	6	4,8	N/A	P301L
	45	FTLD-Tau	65	F	30,5	3,4	315	P301L
	46	FTLD-Tau	66	M	30	5,9	N/A	P301L
	47	FTLD-Tau	85	F	21	5	360	P332S
MA	48	AD	79	F	48	4,7	474	
	49	AD	73	F	26	4,7	460	
	50	AD	55	F	N/A	4,8	416	
	51	AD	75	M	30	4,1	529	
	52	AD	74	M	10	3	N/A	
	53	AD	63	M	18	6,1	366	
	54	AD	61	M	23	7	414	
	55	AD	62	M	10	6	435	

Tableau 2 : Données démographiques et neuropathologiques des cas utilisés pour l'étude. MA, maladie d'Alzheimer. *C9ORF72*, chromosome 9 open reading frame 72; FTLD, frontotemporal lobar degeneration; *GRN*, progranuline; *MAPT*, microtubule-associated protein tau; DPM, délai post-mortem; RIN, RNA integrity number.

Méthodes

I. *Extraction des protéines*

L'extraction des protéines totales est réalisée à partir du cortex cérébral frontal des différents cas. L'homogénéisation est effectuée sur glace à l'aide d'un potter en téflon, avec un tampon de lyse UTS (Urée 8mM, Thiourée 2mM, SDS 1% (Sodium Dodécyl Sulfate)) dans un rapport 1/10 (p/v). Les échantillons sont ensuite soumis aux ultrasons (30 impulsions à 60 Hz) puis centrifugés à 2000g pendant 5 minutes pour éliminer les débris. Les surnageants, contenant les protéines totales des échantillons, sont dosées par la méthode de Bradford à l'aide du kit « Quick Start Bradford Protein Assay » (Bio-Rad) puis conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

II. *Immunoempreinte*

A. **Electrophorèse monodimensionnelle**

Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante SDS, appelée SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electro-phoresis*) à teneur en acrylamide fixe de 12% ou dans un gradient 4-12%. Les homogénats sont mélangés dans un volume adéquat de tampon de dépôt LDS (*Lithium Dodecyl Sulfate*) 4X (Tris-HCl 424mM, Tris-Base 564mM, LDS 8%, Glycerol 40% EDTA 2,04mM Bleu de Coomassie SERVA G250 0.88mM Rouge Phénol 0.700mM, pH 8.5, Invitrogen) supplémenté avec un agent réducteur (Invitrogen) de manière à avoir des concentrations équivalentes pour l'ensemble des échantillons analysés. L'homogénat est ensuite chauffé à 50°C pendant 10 minutes puis 5 ou 10µg de protéines sont déposés dans chacun des puits. Un marqueur de poids moléculaires est également déposé (Invitrogen). La migration dure 1h sous une tension constante de 200V dans du tampon Tris-Glycine (Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 0.1%, pH 8,3, Invitrogen).

B. **Transfert des protéines**

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose d'une porosité de 0,45 µm (*Hybond, GE HealthCare*) sous une tension

Méthodes

constante de 100V pendant 30 minutes. La qualité du transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose est ensuite vérifiée par une coloration réversible au rouge Ponceau (acide trichloroacétique 3% (p/v); Rouge Ponceau 2R 0,2 % (p/v), eau distillée et déminéralisée (ddH2O) qsp 1L).

C. Immunomarquage

Après avoir réalisé le transfert sur la membrane de nitrocellulose, celle-ci est saturée dans une solution de TNT (Tris-HCl 100mM pH=8 ; NaCl 150mM; Tween 20 0,1% (p/v)) contenant soit 5% (p/v) de lait délipidé et lyophilisé soit 5% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) pendant 45 minutes. Les membranes sont ensuite incubées dans une solution contenant un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (**Tableau 3**).

Nom	Abréviation	Epitope	Origine	Fournisseur	Dilution	Référence
Tau						
Anti-Tau total (N-ter)	N-ter	19 premiers aa N-terminaux	Lapin	Maison	1/10 000	(Sergeant et al., 2001)
Anti-Tau total (Tau 5)	Tau 5	Région médiane de Tau (aa 218-225)	Souris	Invitrogen	1/2 000	(Derisbourg et al., 2015)
Anti-Tau total (C-ter)	C-ter	15 derniers aa C-terminaux	Lapin	Maison	1/10 000	(Flament et al., 1989)
Protéines synaptiques						
α -synucléine	α -syn	Synucléin-1 de rat (aa 15-123)	Souris	BD Labsciences	1/500	(Liu et al., 2002b)
Densité post-synaptique 95	PSD-95	PSD-95 humaine	Lapin	Cell Signaling	1/1000	(Du et al., 2012)
Munc-18	Munc-18	Munc-18 de rat (aa 577-594)	Lapin	Sigma	1/10 000	(Hata et al., 1993)
Synaptophysine	SYP	SYP humaine (aa 221-313)	Souris	Santa Cruz	1/10 000	(Andrieux et al., 2002)
Protéines astrocytaires						
Glutamine synthétase	GS	GS humaine (aa 250-350)	Lapin	Abcam	1/10 000	-
Protéine acide fibrillaire gliale	GFAP	GFAP bovine entière	Souris	Santa Cruz	1/1000	(Wang et al., 2013)
Autres						
β -actin	Actin	N-ter	Souris	Sigma-Aldrich	1/10 000	-
Enolase Neuro-Spécifique	NSE	NSE humaine (aa 269-286)	Lapin	Enzo Life Science	1/50 000	-
Aconitase	-	Mitochondries de cœur bovin	Souris	Abcam	1/1000	(Johnson et al., 2014)
Histone H3	H3	Région C-terminale de l'H3 humaine	Lapin	Millipore	1/10 000	(Jin et al., 2015)

Tableau 3 : liste des anticorps utilisés pendant cette étude. Pour chaque anticorps, le nom complet, l'abréviation, l'épitope reconnu, l'origine, le distributeur, la dilution ainsi que la référence bibliographique sont répertoriés.

Les anticorps sont dilués dans la solution de TNT contenant 5% de lait ou 1% de BSA. L'incubation se fait toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes sont rincées avec la

Méthodes

solution de TNT (3 fois) puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce animale utilisée pour produire l'anticorps primaire (Vector Laboratories, INC). L'incubation dure 45 minutes à température ambiante. Les membranes sont alors à nouveau rincées 3 fois pendant 10 minutes avec la solution de TNT.

Le complexe antigène/anticorps est révélé en utilisant la chimiluminescence à l'aide du kit ECL™ (GE HealthCare) ainsi qu'une caméra montée sur une chambre noire (LAS 4000, GE Healthcare). Les images obtenues sont enregistrées numériquement. La quantification des immunoempreintes est réalisée par mesure de la densitométrie via le logiciel ImageJ (Scion Image, USA).

III. 2D-DIGE

L'électrophorèse bidimensionnelle est une technique basée sur une première séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI) puis selon leur masse moléculaire. L'électrophorèse bidimensionnelle différentielle en fluorescence est une forme modifiée de l'électrophorèse bidimensionnelle qui permet de comparer simultanément sur le même gel deux échantillons protéiques à un troisième correspondant à un mélange équimolaire des deux échantillons à comparer. Chacun des deux échantillons est marqué avec une sonde fluorescente différente, le mélange équimolaire avec une troisième sonde fluorescente. L'ensemble de ces trois échantillons est mélangé pour réaliser une analyse 2D combinée. Ainsi, les protéines retrouvées sans variation dans tous les échantillons ont un ratio de fluorescence fixe alors que les protéines qui diffèrent montrent un ratio de fluorescence différent (**Figure 28**). Cette technique assure donc une meilleure reproductibilité et élimine les risques d'inter-variabilité entre les gels. Les expériences de 2D-DIGE exposées dans cette étude ont été effectuées selon le protocole précédemment décrit (Fernandez-Gomez et al., 2014).

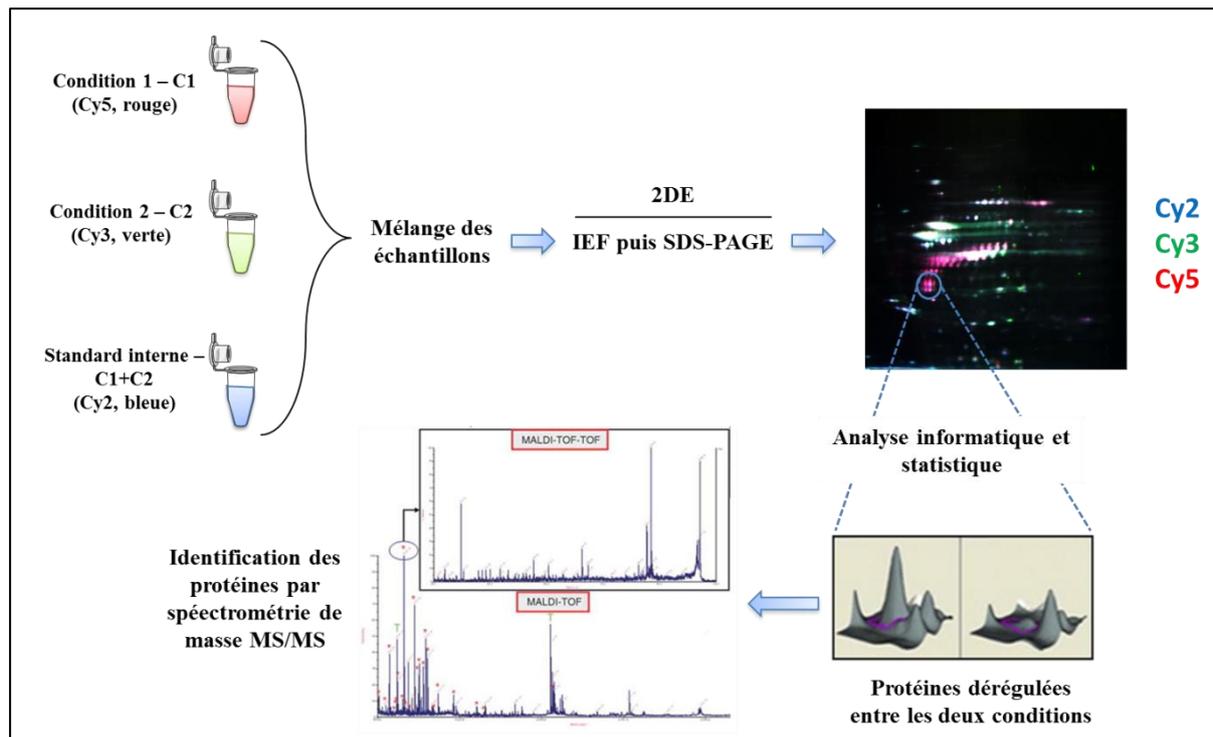


Figure 28 : Représentation schématique de la technique de 2D-DIGE. Les variations d'expression se traduisent par des ratios différents des marqueurs fluorescents vert ou rouge. L'absence de variation est représentée par des spots blancs. L'analyse grâce à un logiciel informatique permet d'identifier toutes les protéines dérégulées. Ces protéines sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse MS puis MS/MS. IEF : isoélectrofocalisation; SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*; 2DE, *two-dimensional electrophoresis*.

A. Préparation des échantillons pour la 2D-DIGE

Afin d'éliminer les lipides et les sels présents dans les échantillons, une précipitation est réalisée par ajout de 3 volumes de méthanol et 1 volume de chloroforme puis de 3 volumes d'eau milli-Q. Après mélange, une centrifugation à 4°C pendant 30 minutes à 12000g permet d'obtenir 3 phases. La première phase supérieure, contenant le chloroforme et les lipides, est éliminée tandis que les deux autres phases en dessous sont reprises dans 3 volumes de méthanol avant d'être à nouveau centrifugées (12000g, 4°C, 30 min). Le surnageant est alors éliminé et le culot est séché à l'air libre à 4°C. Les culots protéiques sont ensuite repris par du tampon UTC (Urée 8M, Thiourée 2M, CHAPS 4% (3-[(3-Cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate)) puis agités mécaniquement pendant 1h à 4°C avant d'être dosés par la méthode de Bradford.

B. Marquage des échantillons par les cyanines (CyDye)

Le marquage des échantillons se fait à l'aide du kit « CyDye DIGE Fluor Minimal Labeling Kit » (G&E HealthCare). Chaque échantillon (50 µg de protéines) est complété avec le tampon UTC afin d'obtenir un volume final de 50 µL. Les échantillons sont alors marqués avec la Cy3 (fluorochrome vert) ou la Cy5 (fluorochrome rouge) à un ratio de 400 pmoles de sonde fluorescente pour 50 µg de protéines. Le standard interne, constitué d'un mélange à part égale des deux échantillons, est quant à lui marqué avec la Cy2 (fluorochrome bleu). La réaction de marquage se fait à 4°C pendant 1h et est ensuite stoppée par ajout de 1µL de DIGE Stop Solution (Lysine 10mM). Les différents échantillons ainsi que le standard interne sont alors mélangés.

C. 1^{ère} dimension : Isoélectrofocalisation (IEF)

Les échantillons marqués sont ajustés à un volume final de 350 µL avec du tampon de réhydratation (UTC 2%, DeStreak 1%, IPGphor Buffer 3-11 NL 1%, bleu de bromophénol 0,05%, G&E HealthCare) puis déposés sur les bandelettes de gels d'IEF (Immobiline DryStrip pH 3-11, G&E HealthCare) afin de les réhydrater. L'étape de réhydratation se fait à température ambiante sur la nuit. L'IEF dure 19h et consiste en des gradients de voltage croissant allant de 150V à 8000V avec voltage final appliqué de 24000V.

D. 2^e dimension : SDS-PAGE

Avant la deuxième séparation, les bandelettes sont rééquilibrées successivement dans deux tampons d'équilibration (Tampon 1 : Tris-HCl 50mM, Urée 6M, SDS 2%, Glycérol 30%, DTT 1%, pH 8.6 ; Tampon 2 : Tris-HCl 50mM, Urée 6M, SDS 2%, Glycérol 30%, Iodoacétamide 4,7%, pH 8.6). Les bandelettes sont ensuite déposées sur un gel d'acrylamide 12%, puis recouvertes d'agarose (Agarose 0,5%, Tris 25mM, Glycérol 0,2M, SDS 0,1%, bleu de bromophénol). La migration se fait sur la nuit à 4°C dans du tampon SDS-PAGE (Tris 25mM, Glycine 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3, Invitrogen) à une puissance constante de 2,5 W/gel. La fluorescence des gels est analysée à l'aide du scanner laser Typhoon FLA 9500 (G&E Healthcare) qui permet de l'excitation des sondes Cy2, Cy3 et Cy5 à leurs longueurs d'onde respectives de 520nm, 580nm et 670nm. Les gels sont scannés avec une résolution de 200 µm et les images sont ensuite exportées pour analyse grâce au logiciel SameSpots (TotalLab).

E. Analyse des images

La détection des “spots” ainsi que leur quantification relative sont réalisées en utilisant le logiciel SameSpots (TotalLab). Un test statistique One-way ANOVA est ensuite appliqué et les variations d’expression sont considérées comme significatives pour une valeur $p < 0,05$. La normalisation entre les différents gels est réalisée par l’intermédiaire du standard interne (Cy2).

F. Gels préparatifs pour l’identification des spots dérégulés

Dans le but d’identifier les protéines d’intérêt, deux gels préparatifs de 2D sont réalisés avec respectivement 500 µg de protéines pour chaque condition. A la suite de l’électrophorèse bidimensionnelle, les gels sont fixés sur la nuit dans une solution contenant 30% d’éthanol et 2% d’acide orthophosphorique (OPA). Après 3 rinçages dans une solution d’OPA 2%, les gels sont incubés dans un tampon de pré-coloration (Ethanol 18%, OPA 2% et Ammonium sulfate 0.9M) puis colorés au bleu de Coomassie (Brillant Blue G-250, Bio-Rad) pendant 48h.

G. Digestion trypsique, spectrométrie de masse et identification des protéines

Les *spots* dont l’expression est significativement modifiée sont manuellement excisés à partir des gels préparatifs. Séparément, les protéines contenues dans chaque spot sont réduites (DTT 10mM) puis alkylées (Iodoacétamide 55mM) avant d’être digérées par la trypsine (Promega) sur la nuit à 37°C, selon les instructions du fabricant. Le lendemain, les surnageants contenant les protéines digérées sont récupérés et lyophilisés en utilisant un concentrateur sous vide (Concentrator 5301, Eppendorf) avant d’être resuspendus dans de l’eau milli-Q supplémentée avec 0,1% d’acide trifluoroacétique (TFA). La solution contenant les peptides est déposée sur une plaque MALDI avec une matrice composée d’acide α -cyano-4-hydroxycinnaminic (10mg/ml dans de l’acétonitrile 50%, TFA 0,1%) fraîchement préparée. L’analyse par spectrométrie de masse est réalisée à l’aide d’un spectromètre MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics). Les données sont analysées avec le logiciel BioTools et les protéines identifiées à l’aide du logiciel Mascot (<http://www.matrixscience.com>), grâce aux séquences des peptides obtenues. L’identification des protéines est considérée comme significative pour un score supérieur à 61.

IV. *Extraction des ARN et analyse quantitative par qRT-PCR* (*quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

Les ARN totaux sont extraits à partir des échantillons de cortex frontal grâce au kit « RNeasy Lipid Tissue Mini Kit » (Qiagen) selon les instructions du fabricant. La concentration des ARN est ensuite déterminée en mesurant l'absorbance à 260nm à l'aide du Nanodrop ND1000 (ThermoScientific).

L'analyse quantitative des ARN de Tau par qRT-PCR a été effectuée selon le protocole précédemment décrit (Belarbi et al., 2011). L'ADNc est obtenu à partir des ARN par rétro-transcription en utilisant 1µg d'ARN comme matrice. L'ARN est tout d'abord chauffé à 68°C pendant 10 minutes afin de casser les structures secondaires et ainsi faciliter la rétro-transcription. L'étape de rétro-transcription se fait à 37°C pendant 1h à l'aide du kit « High Capacity cDNA reverse transcription kit » (Applied Biosystems).

La PCR quantitative en temps réel est effectuée grâce au système « Prism 7900 » en utilisant le « Power SYBER Green PCR Master Mix » (Applied Biosystems). Les conditions de fonctionnement du thermocycleur sont les suivantes : étape de 10 min à 95°C suivie de 45 cycles de deux étapes (15s à 95°C puis 25s à 60°C). Les amorces utilisées sont les suivantes : Tau 5'UTR (untranslated region) 5'ACAGCCACCTTCTCCTCCTC3' et 5' GATCTTCCATCACTTCGAACTCC3'; Tau Exons 11-12 (E11-12) 5'ACCAGTTGACCTGAGCAAGG3' et 5' AGGGACGTGGGTGATATTGT3' et RPLP0 5'GCAATGTTGCCAGTGTCTG3' et 5' GCCTTGACCTTTTCAGCAA3'. L'expérience est faite en triplicate et l'expression relative du gène cible est déterminée par la méthode du $\Delta\Delta CT$ (Livak et Schmittgen 2001).

V. *Analyses statistiques*

Les données obtenues par la technique d'immunoempreinte et de RT-qPCR ont été analysées en utilisant le test non-paramétrique de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) et la significativité statistique a été définie de la manière suivante : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Les données sont exprimées en tant que moyenne \pm erreur standard.

PARTIE I : REDUCTION DES
PROTEINES TAU SOLUBLES DANS
LES CAS DE FTLD-TDP PORTANT
DES MUTATIONS SUR LE GENE DE
LA PROGRANULINE

Résultats

L'examen neuropathologique et génétique de tous les cas étudiés a été réalisé préalablement au département d'anatomo-pathologie du CHRU de Lille ou de l'hôpital Pitié-Salpêtrière. Les informations détaillées sur la pathologie ainsi que les données démographiques sont indiquées dans le **Tableau 2**. Ainsi, nous avons pu les analyser par groupe selon ces données: 10 patients présentent des mutations sur le gène *GRN*, 10 présentent la mutation *C9ORF72*, 8 ne présentent aucune mutation connue, 5 présentent une pathologie FUS, et enfin 5 présentent des mutations sur le gène *MAPT*.

I. Etude de la phosphorylation des protéines Tau

Notre premier objectif était de procéder à la caractérisation biochimique des protéines Tau dans le tissu cérébral des cas FLTD et témoins, en utilisant la technique d'immunoempreinte. Dans ce but, nous avons utilisé à la fois des anticorps dirigés contre les formes phosphorylées des protéines Tau mais aussi des anticorps reconnaissant les protéines Tau indépendamment de toutes modifications post-traductionnelles (**Figure 29**).

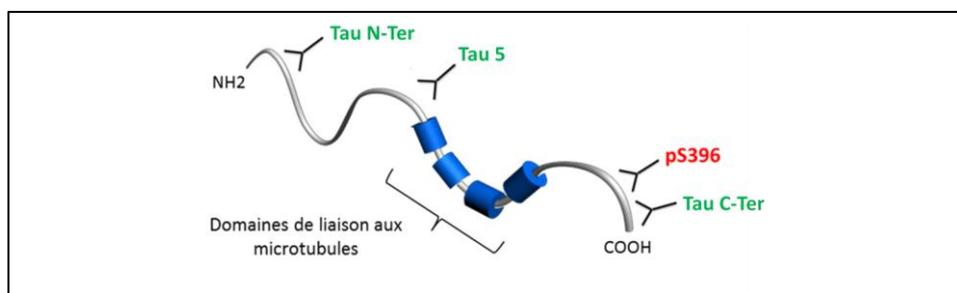


Figure 29 : Représentation schématique de la protéine Tau et des épitopes reconnus par les anticorps. Les anticorps Tau N-ter, Tau 5 et Tau C-ter (en vert) reconnaissent respectivement la partie N-terminale, centrale et C-terminale de la protéine Tau indépendamment de son état de phosphorylation. L'anticorps pS396 (en rouge) reconnaît les protéines Tau phosphorylées sur le résidu sérine 396.

La présence de pathologie Tau ayant été décrite dans certains cas de FTLT-TDP (Behrouzi et al., 2016), nous avons tout d'abord examiné la présence de formes phosphorylées de Tau dans les différents cas. Néanmoins, aucun signal n'a pu être détecté avec l'anticorps phospho-dépendant (pS396) chez les patients atteints de FTLT-TDP en comparaison avec ceux présentant une maladie d'Alzheimer ou une FTLT-Tau (**Figure 30**). Ce résultat, associé à l'absence de lésions Tau lors de l'examen neuropathologique, exclu donc la présence de protéines Tau agrégées chez ces patients.

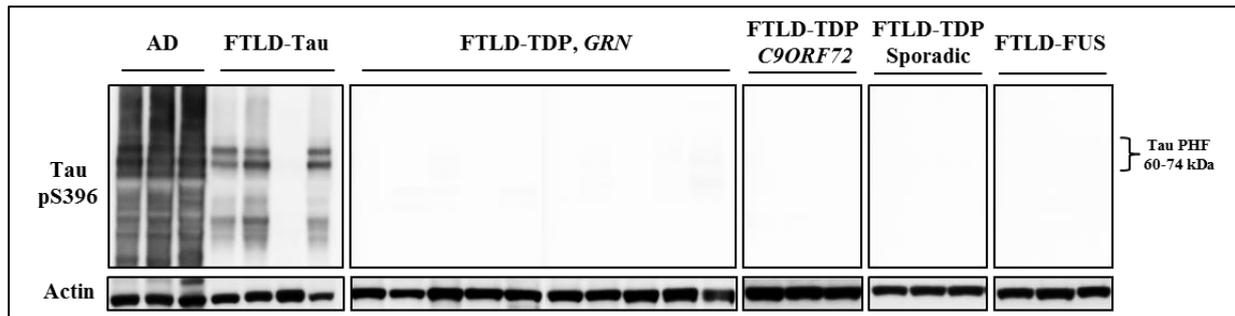


Figure 30 : Absence de protéines Tau phosphorylées dans les cas de FTLD. Analyse par immunoempreinte de l'expression des protéines Tau phosphorylées sur le résidu serine 396. Données représentatives de 10 cas FTLD-TDP-GRN, 10 FTLD-TDP-C9ORF72, 8 FTLD-TDP sporadiques, 5 FTLD-FUS sporadiques, 4 FTLD-Tau, 3 MA et 8 témoins.

II. Etude de l'expression des protéines Tau solubles

Afin d'évaluer la quantité totale de protéine, l'expression des protéines Tau solubles a ensuite été étudiée en utilisant les anticorps ciblant la protéine Tau indépendamment de son état de phosphorylation. Ces anticorps, très bien caractérisés, ciblent des épitopes situés sur la partie amino-terminale (Tau N-ter), médiane (Tau 5) ou carboxy-terminale de Tau (**Figure 29**). Dans le cerveau adulte humain, nous avons vu que l'épissage alternatif des transcrits de Tau permettait la production de 6 isoformes différentes (Buée et al., 2000). Ces isoformes donnent ainsi naissance à une signature biochimique tout à fait particulière constituée de 3 bandes majoritaires comprises entre 60 et 69 kDa (**Figure 31a**, cas témoins 1 à 3). De manière frappante, l'analyse par immunoempreinte a révélé une réduction significative de ces 6 isoformes de Tau dans le cerveau de 8 cas FTLD-TDP en comparaison avec les individus témoins, mais également avec les autres cas de FTLD (patients 22 à 29, **Figure 31a**). De plus, le fait que cette diminution soit observée avec l'ensemble des anticorps testés suggère qu'il s'agit bien d'une réduction des holoprotéines de Tau et non pas d'une protéolyse préférentielle chez ces patients (**Figure 31a**, comparez le cas 25 avec le cas 33). De façon encore plus intéressante, cette réduction de l'expression des protéines Tau est restreinte aux cas de FTLD-TDP portant une mutation sur le gène de la progranuline (**Figure 31a et b**) et n'est pas retrouvée chez les autres cas de FTLD. En effet, l'expression des protéines Tau chez les cas FTLD-TDP-C9ORF72, FTLD-TDP et FUS sporadiques est relativement homogène d'un patient à l'autre, et ce, avec chacun des anticorps utilisés (**Figure 31a et b**). Suite à ces résultats, les cas de FTLD-TDP-GRN montrant une réduction des protéines Tau furent désignés sous le terme de FTLD-TDP-GRN τ (pour *low tau protein level*) et les autres cas de FTLD-TDP affichant une expression conservée des protéines Tau, FTLD-TDP τ (pour *normal Tau protein level*).

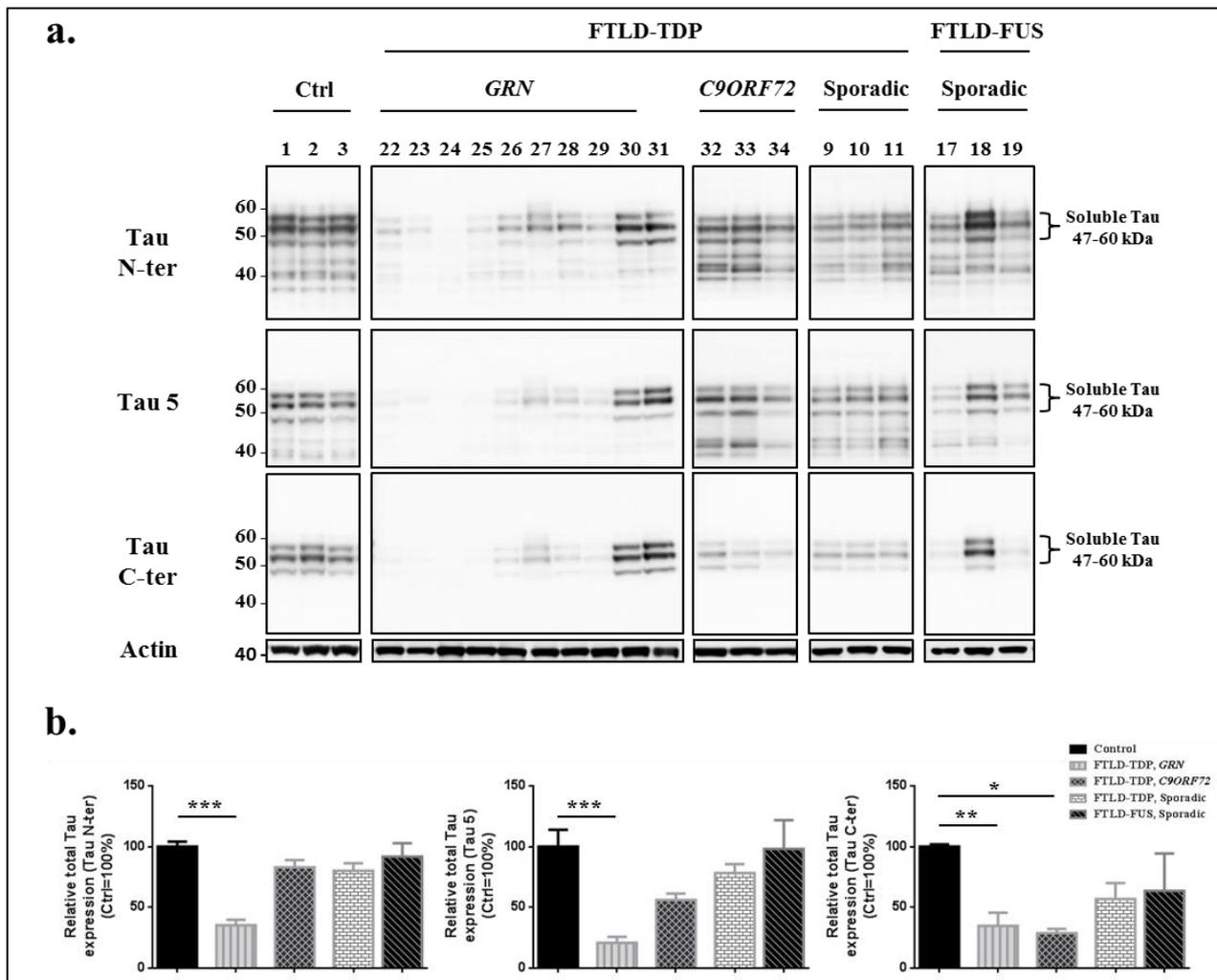


Figure 31 : Réduction de la quantité de protéines Tau dans les cas de FTLD-TDP-GRN. (a) Analyse par immunoempreinte de l'expression des protéines Tau solubles dans les cerveaux de patients atteints de FTLD et d'individus sains. Des anticorps ciblant les protéines Tau totales indépendamment de toutes modifications post-traductionnelles ont été utilisés (Tau C-ter, Tau 5 et Tau N-ter). Données représentatives de 10 cas FTLD-TDP-GRN, 10 FTLD-TDP-C9ORF72, 8 FTLD-TDP sporadiques, 5 FTLD-FUS sporadiques et 8 témoins. (b) L'expression des protéines Tau a été quantifiée et normalisée par rapport à un échantillon contenant une quantité équivalente de protéines de chaque tissu cérébral témoin utilisé dans cette étude. Les formes entières et tronquées des protéines Tau ont été prises en compte pour la quantification. L'Actine a servi de contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Kruskal-Wallis (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

III. Etude des mécanismes potentiellement impliqués dans la réduction des protéines Tau

A. Analyse de l'expression du gène *MAPT*

La réduction du niveau des protéines Tau pourrait refléter une diminution de l'expression du gène *MAPT* chez les patients FTLD-TDP-*GRN* τ . Afin de mesurer la quantité totale d'ARNm, nous avons donc réalisé une RT-qPCR en utilisant deux couples de sondes ciblant des régions constitutives des transcrits de Tau (5' UTR et E11-12). Cependant, aucun des deux couples de primers ne révéla une différence significative d'expression des ARNm entre les différents groupes de FTLD et les individus témoins (**Figure 32**). Ainsi, en accord avec les précédents résultats publiés en 2001 (Zhukareva et al., 2001), la diminution des protéines Tau ne semble pas pouvoir s'expliquer par une modification de la transcription du gène *MAPT*.

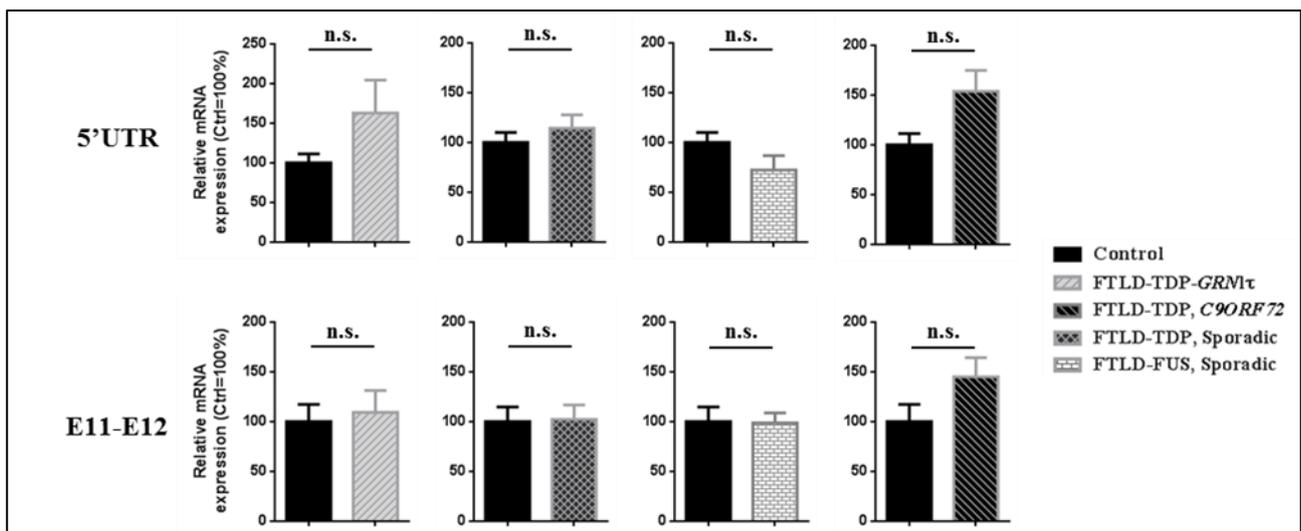


Figure 32 : Conservation de l'expression des ARNm de Tau dans les FTLD-TDP-*GRN* τ . La quantité d'ARNm totale de Tau a été mesurée par qPCR chez les individus sains ou atteints de FTLD. Les deux couples de primers, 5'UTR (*untranslated region*) et E11-12 (exons 11-12), ciblent des séquences constitutives des transcrits de Tau. Les valeurs obtenus ont été normalisées par rapport au groupe témoin (100% d'expression) et le gène codant pour RPLP0 (*large ribosomal protein P0*) a servi de gène de référence. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Mann-Whitney. (*ns* non significatif), n = 5-10/groupe.

B. Etude de la présence d'exons cryptiques au sein des transcrits de Tau

Bien que l'expression des ARNm soit conservée, il est possible que ces derniers ne soient pas traduits correctement. Parmi les mécanismes possibles, l'inclusion d'exons alternatifs cachés (ou encore exons cryptiques) peut notamment conduire à la production d'ARNm non fonctionnels. L'exon 6 de l'ARN de Tau comprend différents sites d'épissage en 3' qui peuvent aboutir à la formation de 3 différents exons, un constitutif (6c) et deux cryptiques (6p et 6d) (Caillet-Boudin et al., 2014) (**Figure 35a**). Bien que cet exon soit principalement présent dans le système nerveux périphérique, le laboratoire a mis en évidence une augmentation de l'inclusion de l'exon 6d dans le cerveau de patient atteints de dystrophie myotonique de type 1 (Leroy et al., 2006) (**Figure 35a**). De plus, il est tout à fait intéressant de noter que TDP-43 a récemment été montrée comme pouvant réprimer l'inclusion d'exons cryptiques (Ling et al., 2015). Dans cette même étude, la déplétion en TDP-43 favorise l'inclusion d'exons cryptiques conduisant à la production d'ARN non fonctionnels ou dégradés de façon précoce. Ainsi, l'augmentation de l'inclusion des exons 6p ou 6d dans l'ARN de Tau chez les patients FTLN-TDP-GRN τ pourrait empêcher leur traduction ou aboutir à la formation de formes tronquées, qui seraient dégradées plus rapidement.

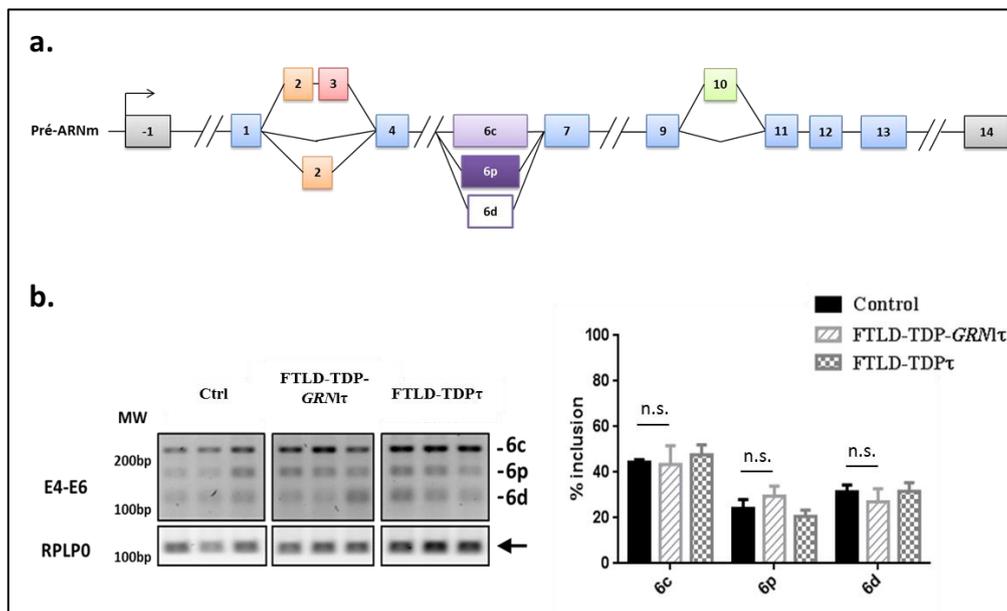


Figure 33 : Aucune augmentation de l'inclusion d'exons cryptiques n'est observée au sein des ARNm de Tau chez les patients FTLN-TDP-GRN τ . (a) Représentation du pré-ARNm de Tau et des exons alternatifs 2, 3 et 10. L'insertion de l'exon 6 (en violet), diffère en fonction du site d'épissage utilisé en 3' (6c, 6p ou 6d). (b) Analyse par PCR de l'épissage de l'exon 6 dans le tissu cérébral des patients FTLN-TDP-GRN τ , FTLN-TDP τ et des cas témoins. Les résultats indiquent le % d'inclusion de la forme constitutive (6c) et des formes cryptiques (6p et 6d) de l'exon 6. Données représentatives de 8 cas FTLN-TDP-GRN τ , 20 cas FTLN-TDP τ (n=20) et 8 cas témoins. Le gène codant pour RPLP0 (*large ribosomal protein P0*) a servi de gène de référence. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Kruskal-Wallis. (ns non significatif).

Pour vérifier cela, nous avons donc réalisé une PCR en utilisant un couple de sondes encadrant l'exon 6. Les résultats ont permis de mettre évidence 3 bandes correspondant aux à l'exon 6 épissé aux trois sites différents (**Figure 33b**). Néanmoins, aucune augmentation de l'inclusion des formes cryptiques 6p et/ou 6d n'a été détectée dans le groupe FTLD-TDP-GRN τ en comparaison avec les autres cas de FTLD-TDP et les individus témoins (**Figure 33b**). Ainsi, l'insertion d'exons cryptiques au niveau de l'exon 6 ne semble pas être la cause de la réduction du niveau des protéines Tau, suggérant l'implication d'autres mécanismes post-transcriptionnels dans ce phénomène.

C. Etude des facteurs impliqués dans la dégradation de Tau

Une augmentation de la dégradation des protéines Tau pourrait également être responsable de cette réduction d'expression des protéines Tau chez les patients FTLD-TDP-GRN τ . L'autophagie étant la principale voie de dégradation des protéines Tau, nous avons étudié l'expression des facteurs impliqués dans ce mécanisme tels que p62, LC3b (I et II) et LAMP2A par immunoempreinte. Néanmoins, aucune augmentation de leur expression n'a été détectée en comparaison avec le groupe témoin (**Figure 34**). A noter que le ratio entre les formes LC3b I et LC3b II (forme recruté à la membrane de l'autophagosome) est identique entre les deux groupes (résultat non montré). Ainsi, l'augmentation de la dégradation de Tau par la voie autophagique ne semble pas être à l'origine de la réduction d'expression de Tau.

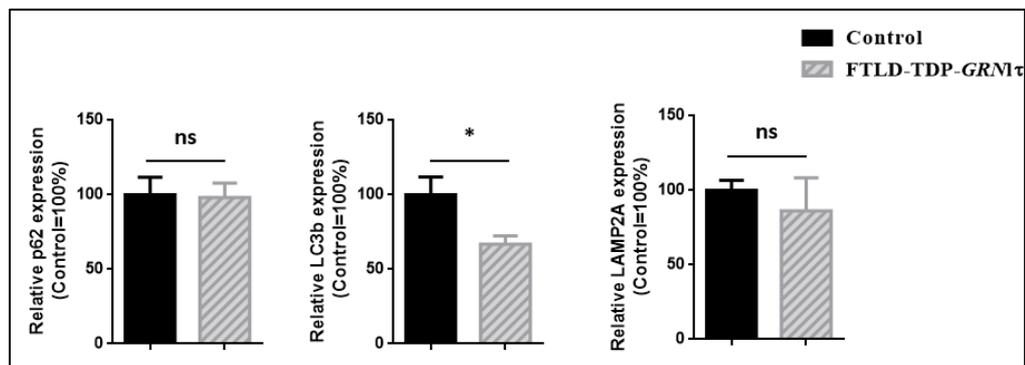


Figure 34 : Absence d'augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la dégradation de Tau chez les patients FTLD-TDP-GRN τ . Analyse par immunoempreinte de l'expression de p62, LC3b, LAMP2A dans les groupes FTLD-TDP-GRN τ et témoin. Données représentatives de 8 cas FTLD-TDP-GRN τ et 8 témoins. L'expression des protéines a été quantifiée et normalisée par rapport à un échantillon contenant une quantité équivalente de protéines de chaque tissu cérébral témoin utilisé dans cette étude. L'Actine a servi de contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Mann-Whitney (ns, non significatif ; * $p < 0.05$).

D. Contrôle de la qualité des échantillons de tissus cérébraux

La réduction des protéines Tau dans le groupe FTLD-TDP-GRN τ pourrait être le reflet d'une détérioration globale du protéome dans ces échantillons. Pour éliminer cette possibilité, nous avons donc étudié l'expression de plusieurs marqueurs tels que la NSE (pour *neuronal specific enolase*), l'Aconitase (une enzyme mitochondriale), l'Histone H3 (impliquée dans la structuration de l'ADN) et les neurofilaments. Néanmoins, l'analyse par immunoempreinte a révélé que le niveau de ces différentes protéines restait relativement inchangé entre les différents groupes de FTLD (**Figure 35**).

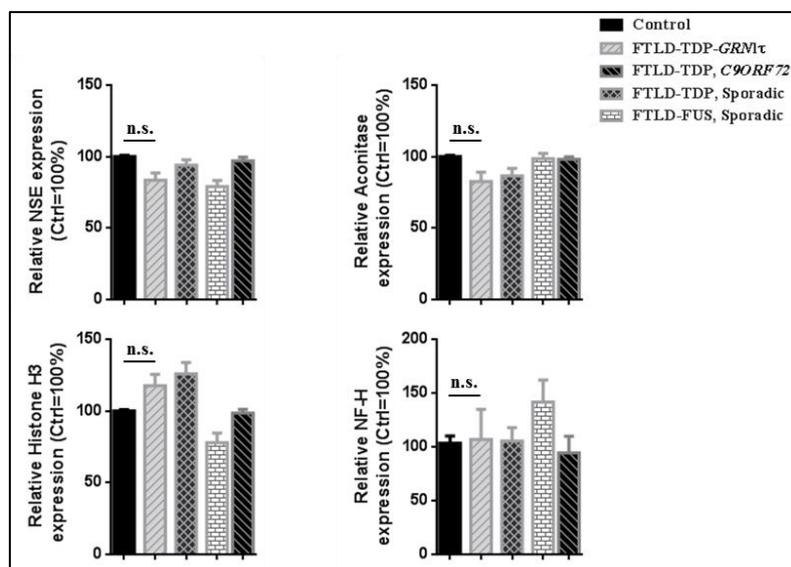


Figure 35 : Mise en évidence de la préservation de plusieurs marqueurs dans les cas de FTLD. Analyse par immunoempreinte de l'expression de NSE, (*neuronal specific enolase*), de l'Aconitase, d'Histone H3 et des neurofilaments lourds chez les cas témoins et FTLD. Données représentatives de 8 cas FTLD-TDP-GRN τ , 10 FTLD-TDP-C9ORF72, 8 FTLD-TDP sporadiques, 5 FTLD-FUS sporadiques et 8 témoins. L'expression des protéines a été quantifiée et normalisée par rapport à un échantillon contenant une quantité équivalente de protéines de chaque tissu cérébral témoin utilisé dans cette étude. L'Actine a servi de contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Kruskal-Wallis (ns, non significatif).

Par ailleurs, il est également intéressant de souligner qu'aucune corrélation entre la réduction des protéines Tau, l'atrophie cérébrale, le délai post-mortem et le RIN (pour *RNA Integrity Number*) – qui permet d'évaluer la qualité des échantillons – n'est observée (**Figure 36** et **Tableau 2**). Ainsi, ces résultats démontrent que les facteurs pouvant influencer sur la conservation des tissus cérébraux ne sont pas responsables de la baisse d'expression de Tau.

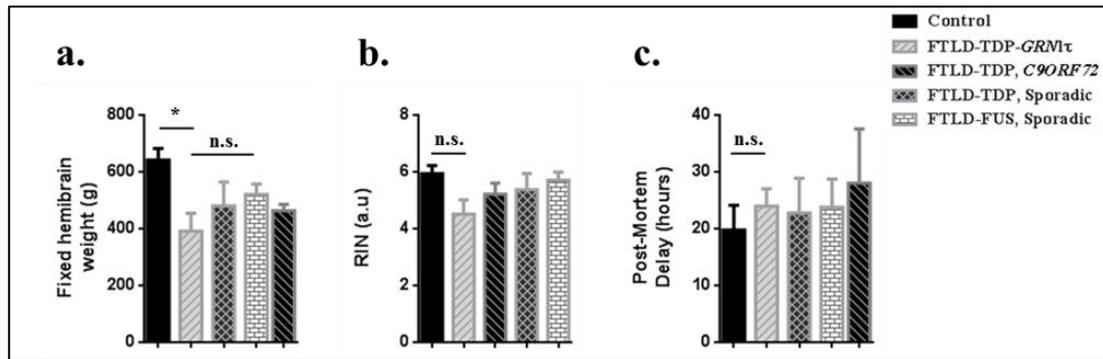


Figure 36 : la réduction des protéines Tau observée dans le tissu cérébral des cas FTLN-TDP-GRNτ ne résulte pas de facteurs externes tels qu'un délai post-mortem plus long, une dégradation accrue des échantillons (évaluée par le RIN), ou une atrophie corticale plus importante. (a) Poids de l'hémisphère fixé, (b) délai post-mortem et (c) RIN (*RNA integrity number*) des FTLN-TDP-GRNτ, FTLN-TDP-C9ORF72, FTLN-TDP sporadiques, FTLN-FUS sporadiques et témoins. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Kruskal-Wallis (* $p < 0.05$; *ns* non significatif). a.u, *arbitrary unit*.

IV. Comparaison des protéomes entre les cas FTLN-TDPτ et FTLN-TDP-GRNτ

La diminution de l'expression des protéines Tau ne s'accompagnant pas d'une modification des ARNm, nous nous sommes donc demandé si d'autres protéines pouvaient être affectées. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé le protéome des patients FTLN-TDPτ (n=3, patients 14, 15 et 16) et FTLN-TDP-GRNτ (n=3, patients 22, 24 et 25) en utilisant la technique de 2D-DIGE (**Figure 28**). A la suite de l'analyse bioinformatique des gels de 2D-DIGE, 26 spots ont été mis en évidence comme étant différentiellement exprimés de manière significative entre le groupe FTLN-TDP-GRNτ et FTLN-TDPτ (**Figure 37, Tableau 4**). Parmi les 26 spots, l'analyse par spectrométrie de masse a identifié 20 protéines différentes ainsi que 6 isovariants (poids moléculaire et/ou pI différent) de ces mêmes protéines (**Tableau 4**).

En examinant les fonctions cellulaires associées à ces protéines, nous avons pu montrer que 11 d'entre elles étaient impliquées dans le métabolisme, et plus particulièrement dans la voie de la glycolyse (**Tableau 4**). En parallèle, une augmentation de l'expression d'HSP-70, une protéine impliquée dans l'homéostasie protéique en condition de stress, et de protéines structurales telles que la Gelsoline et les Neurofilaments légers a également été observée (**Tableau 4**).

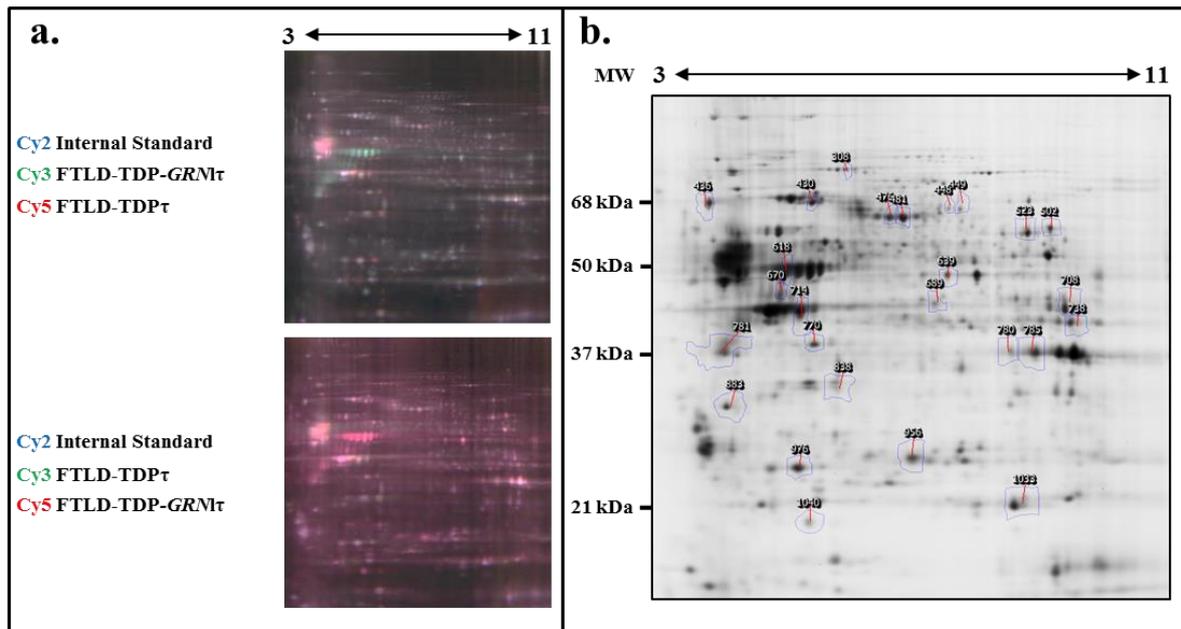


Figure 37 : Analyse par 2D-DIGE (*two dimensional differential gel electrophoresis*) du cortex frontal chez les cas FTLD-TDP-GRN1 τ et FTLD-TDP τ . L'analyse 2D-DIGE a été réalisée grâce au logiciel SameSpot (TotalLab). (a) Superposition des signaux fluorescents obtenus avec les deux combinaisons de cyanines (Cy) possibles. En haut, le groupe FTLD-TDP-GRN1 τ est marqué avec la Cy3 (verte) et le groupe FTLD-TDP τ avec la Cy5 (rouge). En bas, le groupe FTLD-TDP-GRN1 τ est marqué avec la Cy5 (rouge) et le groupe FTLD-TDP τ avec la Cy3 (verte). Quel que soit la combinaison, le standard interne est marqué avec la Cy2 (bleue). (b) Carte des *spots* différemment exprimés entre le groupe FTLD-TDP-GRN1 τ et FTLD-TDP τ . La liste et la description des *spots* d'intérêts (indiqués par des nombres) sont présentées dans le **Tableau 4. kDa: kiloDalton; MW: *molecular weight*.**

En revanche, l'expression de UCH-L1 (spot 976, -1,3), une enzyme neuronale jouant un rôle dans la prise en charge des protéines ubiquitinylées, semble diminuée dans le cortex frontal des patients FTLD-TDP-GRN1 τ en comparaison avec les patients FTLD-TDP τ . De manière très intéressante, un groupe de protéine impliquée au niveau synaptique a aussi été mis en évidence comme étant particulièrement affectée chez les FTLD-TDP-GRN1 τ . En effet, l'expression des protéines codées par les gènes *STXB1*, *DPYL2* et *GLNA* est diminuée dans le tissu cérébral de ces patients, suggérant une altération synaptique plus importante (**Tableau 4**). Des protéines spécifiques des astrocytes sont également modulées. On retrouve ainsi une diminution de la glutamine synthétase (GS, spot 689, -1,2) – une enzyme essentielle à la régulation du métabolisme glutamatergique – alors que la GFAP affiche une augmentation très importante chez les patients FTLD-TDP-GRN1 τ (spot 618, +3,2) (**Tableau 4**). A noter que 3 autres isovariants de la GFAP présentent une augmentation similaire.

Partie I : Résultats

Spot n°	Protein Name	Accession No.	Gene Name	p-value	Fold change	Theoretical pI/MW	Apparent pI/MW	Mascot score	% sequence coverage
Cytoskeleton related proteins									
308	Gelsolin	P06396	<i>GSN</i>	0.001	+ 1.4	5.9/85	5.9/85	77	1.4
436	Neurofilament light polypeptide	P07196	<i>NEFL</i>	4.57E-04	- 1.5	4.5/61.5	4.5/61.5	202	34.3
Metabolism related proteins									
780	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (2)	P04406	<i>GAPDH</i>	0.001	+ 1.3	8.6/36	8.4/36	63.5	21.2
1040	Ferritin light subunit	P02792	<i>FTL</i>	3.67E-06	+ 2.2	5.4/20	5.4/20	354.5	30.3
738	Fructose 1,6 biphosphate aldolase	P04075	<i>ALDOA</i>	0.0037	+ 1.2	9.2/39.4	9.2/39.4	81	33.5
639	Alpha-enolase	P06733	<i>ENO1</i>	1.57E-04	+ 1.9	7.7/47.1	7.7/47.1	178	44.5
1033	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P30086	<i>PEBP1</i>	0.007	+ 1.3	7.4/21	<u>8.4/21</u>	101	56.7
956	Peroxiredoxin 6	P30041	<i>PRDX6</i>	1.94E-05	+ 1.9	6.3/25	<u>7.0/25</u>	147	52.2
523	Pyruvate Kinase M (2)	P14618	<i>PKM</i>	0.019	+ 1.2	9.0/60	<u>8.4/60</u>	93.9	31.8
708	Phosphoglycerate kinase 1	P00558	<i>PGKI</i>	0.023	+ 1.2	9.2/45	9.2/45	95.2	29.5
770	N(G).N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	O94760	<i>DDAH1</i>	4.36E-04	+1.3	5.5/31.1	<u>5.8/43</u>	121	44.6
838	Guanine nucleotide-binding protein 1	P62873	<i>GNBI</i>	7.02E-05	- 1.6	5.6/37	5.6/37	117	42.9
714	Creatine Kinase B	P12277	<i>CKB</i>	0.004	- 1.2	5.2/42.6	<u>5.6/42.6</u>	206	54.9
Astrocytic related proteins									
618	Glial fibrillary acidic protein (3)	P14136	<i>GFAP</i>	2.43E-06	+ 3.2	5.3/49.8	5.5/49.8	287	56.4
689	Glutamine synthetase	P15104	<i>GLUL</i>	0.003	- 1.2	6.5/42	<u>7.2/42</u>	69.4	16.4
Synaptic related proteins									
476	Dihydropyrimidinase-related protein 2 (2)	Q16555	<i>DPYSL2</i>	4.62E-04	- 1.3	5.9/62.3	<u>6.6/62.3</u>	274	50.1
448	Syntaxin-binding protein 1 (2)	P61764	<i>STXB1</i>	3.70E-04	- 1.3	6.5/67.5	<u>7.6/60</u>	138	22.6
Other									
883	Annexin 5	P08758	<i>ANXA5</i>	1.75E-04	+ 1.5	4.8/35.9	4.8/35.9	188	45.6
976	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoenzyme L1	P09936	<i>UCHL1</i>	0.003	- 1.3	5.2/25	5.2/25	85.8	47.1
430	Heat shock 70 kDa protein 1A	P0DMV8	<i>HSPA1A</i>	0.002	+ 1.3	5.4/70	<u>5.4/60</u>	110	27.9

Tableau 4 : Liste des protéines différentiellement exprimées entre les groupes FTLD-TDP-GRN1 τ et FTLD-TDP τ . Les données obtenues à partir du logiciel SameSpot sont indiquées pour chaque *spot* d'intérêt : numéro du *spot* correspondant, *p-value*, *fold change* (FTLD-TDP-GRN1 τ vs FTLD-TDP τ), poids moléculaire expérimental (MW) and point isoélectrique (pI). Les informations issues de l'analyse par spectrométrie de masse sont également présentées: nom de la protéine, numéro d'accession, gène associé, score d'identification (Mascot), séquence couverte lors de l'identification (%), poids moléculaire (MW) et point isoélectrique (pI) théorique de la protéine. Un score d'identification supérieur à 61 est considéré comme pertinent. Les différences entre la valeur théorique et expérimentale du MW ou pI sont soulignées. Le nombre d'isovariants pour chaque protéine est indiqué à côté du nom de la protéine, entre parenthèse.

Ainsi, ces résultats démontrent une corrélation forte entre la réduction de l'expression des protéines Tau et un dysfonctionnement à la fois au niveau synaptique et astrocytaire. En outre, ces données mettent en évidence que l'expression de plusieurs protéines autres que Tau est dérégulée dans le cerveau des patients atteints de FTLN-TDP associés à une mutation du gène de la progranuline.

V. *Validation des résultats obtenus en protéomique par immunoempreinte*

Fort de ces résultats obtenus en protéomique, nous avons ensuite entrepris de les valider dans l'ensemble des cas de l'étude par la technique d'immunoempreinte. En effet, la technique de 2D-DIGE ne permet pas de comparer tous les cas de manière simultanée. Ainsi, afin de s'assurer de la pertinence des données issues de l'étude protéomique, une validation des différents marqueurs pour chacun des cas étudiés est nécessaire. Par conséquent, nous avons évalué l'expression des différentes protéines identifiées en 2D-DIGE dans le tissu cérébral des patients FTLN-TDP-GRN τ , FTLN-TDP τ mais également des individus témoins.

Tout d'abord, nous avons confirmé l'augmentation d'HSP-70 chez les patients FTLN-TDP-GRN τ (**Figure 38 a et b**). De manière très marquée, une hausse de la quantité de GFAP, similaire à celle observée en 2D-DIGE, est retrouvée dans le groupe FTLN-TDP-GRN τ en comparaison les individus témoins et les autres cas de FTLN-TDP (**Figure 38 a et b**). Cela s'accompagne notamment d'une baisse significative de la GS (**Figure 38 a et b**). Concernant les protéines synaptiques, l'étude de l'expression de plusieurs marqueurs pré et post-synaptiques tels que l' α -synucléine et PSD-95, révèlent une réduction dramatique de leur expression (**Figure 38 a et b**). Ces résultats confirment ainsi ceux obtenus en 2D-DIGE et confortent la présence de dérégulations spécifiques au sein des FTLN-TDP-GRN τ , notamment une altération synaptique importante ainsi qu'une astroglie réactive massive.

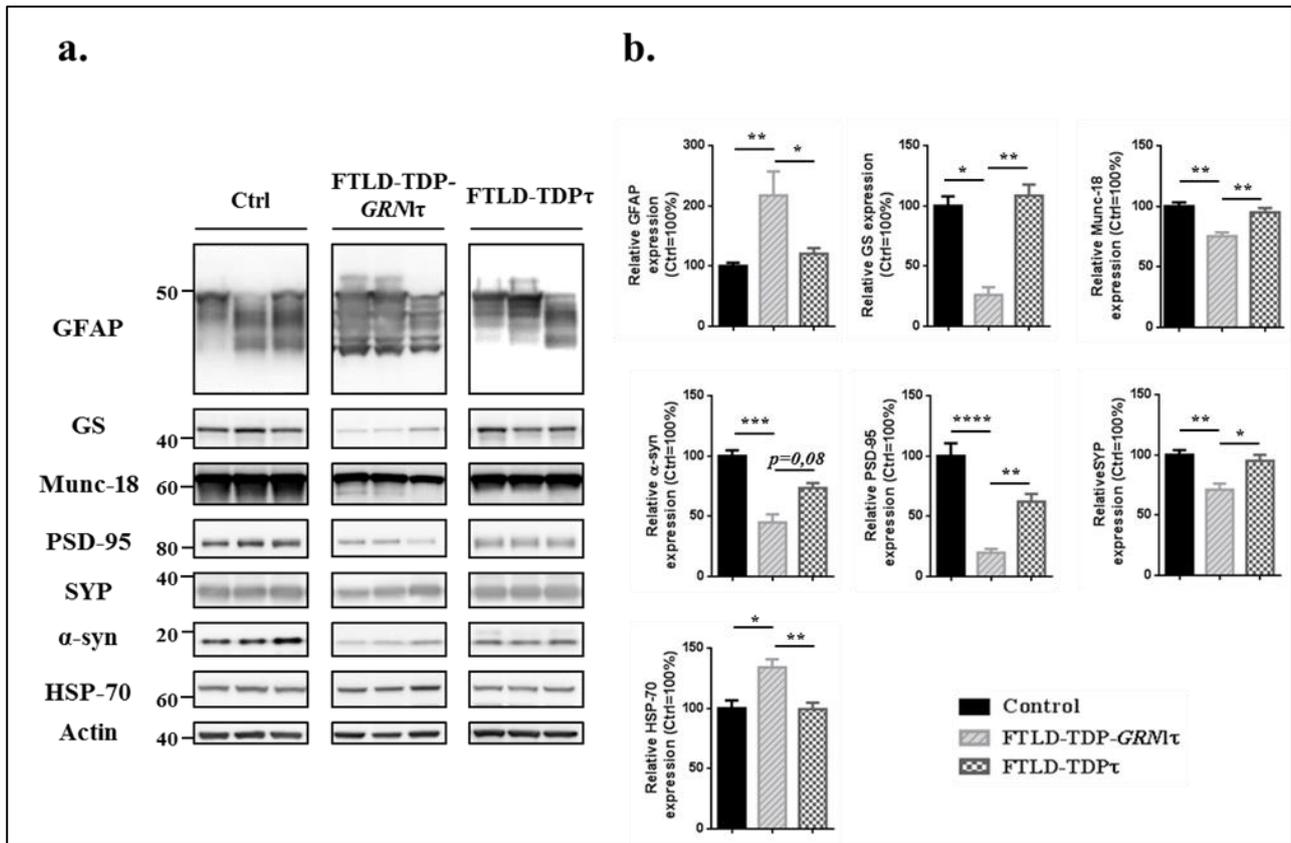


Figure 38 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins, FTLN-TDP-GRN1τ et FTLN-TDPτ par la technique d'immunoempreinte. (a) Analyse par immunoempreinte des protéines synaptiques [PSD-95, α-synucléin (α-syn), Munc-18 et Synaptophysine (SYP)], astrocytaires [GFAP and Glutamine Synthétase (GS)] ou associées au stress cellulaire (HSP-70) dans le tissu cérébral des individus témoins, FTLN-TDP-GRN1τ et FTLN-TDPτ. Données représentatives de 8 cas FTLN-TDP-GRN1τ, 20 cas FTLN-TDPτ et 8 cas témoins. (b) L'expression des protéines a été quantifiée et normalisée par rapport à un échantillon contenant une quantité équivalente de protéines de chaque tissu cérébral témoin utilisé dans cette étude. L'Actine a servi de contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Kruskal-Wallis (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Discussion-Conclusion

I. *Pertinence de la réduction des protéines Tau dans les FTLD*

En 2001, Zhukareva et ses collègues décrivaient une réduction partielle ou totale des protéines Tau solubles dans la substance noire et blanche du cerveau de patients atteints de DLBD. Pour la première fois depuis ces travaux, nos résultats démontrent clairement que la réduction des protéines Tau solubles est spécifiquement associée aux patients présentant une FTLD-TDP associée à une mutation sur le gène de la progranuline. En effet, bien que plusieurs cas de l'étude affichent une réduction de Tau avec l'anticorps ciblant la partie C-terminale, le marquage obtenu avec les deux autres anticorps montre une relative conservation des protéines Tau. Ce résultat suggère donc une dégradation préférentielle de Tau au niveau de la région C-terminale chez ces patients. Ce qui n'est pas le cas avec les FTLD-TDP-GRN τ , où l'ensemble des anticorps utilisés montre une réduction importante du signal.

II. *Comment expliquer cette réduction des protéines Tau ?*

A. Une dérégulation transcriptionnelle peut-elle expliquer cette réduction ?

En accord avec les précédentes études (Zhukareva et al., 2001, 2003), la réduction de l'expression des protéines Tau ne semble pas résulter d'une mort neuronale plus importante chez les patients FTLD-TDP-GRN τ comme le montre la préservation de plusieurs marqueurs neuronaux. En outre, l'absence de corrélation entre l'expression des protéines Tau, le délai *post-mortem*, le RIN et l'atrophie corticale indique qu'une dégradation préférentielle des tissus cérébraux n'est pas non plus à l'origine de la baisse d'expression de Tau. Par ailleurs, au regard de la conservation de l'expression des ARNm de Tau dans le groupe FTLD-TDP-GRN τ , la réduction de l'expression du gène *MAPT* ne semble pas non plus être le mécanisme responsable. Finalement, aucune augmentation de l'inclusion des exons cryptiques 6p et 6d, qui aurait pu aboutir à la production d'ARNm altérés, n'est observée au sein des ARNm de Tau. Au final, ces résultats confortent et affinent ceux obtenus par Zhukareva en 2001 en suggérant l'implication d'une dérégulation au niveau post-transcriptionnel comme cause de cette réduction des protéines Tau.

B. Quel lien avec TDP-43 ?

Précédemment nous avons vu que TDP-43, qui représente la principale protéine agrégée dans les cas de FTLD-TDP-GRN τ , est une protéine essentielle au métabolisme des ARN (pour revue, (Ratti et Buratti, 2016)). Au regard de la réduction des protéines Tau observée dans FTLD-TDP-GRN τ , le rôle de TDP-43 dans la stabilisation, le transport et la traduction locale des ARNm est particulièrement intéressant. En effet, une dérégulation de ces fonctions pourrait être à l'origine d'une altération de la traduction des ARNm de Tau. En ce sens, une étude récente a notamment montré que la perte de fonction de TDP-43 conduisait à l'altération du transport microtubule-dépendant des granules de transport des ARNm vers les prolongements neuronaux (Alami et al., 2014). Or, les ARNm de Tau étant traduits localement au niveau des axones (Aronov et al., 2001), une perte de fonction de TDP-43 pourrait ainsi aboutir à un défaut de traduction de ces ARNm. Cette hypothèse est d'autant plus renforcée que des preuves de la fixation de TDP-43 sur les transcrits de Tau ont été avancées (Polymenidou et al., 2011). Par ailleurs, TDP-43 est également impliquée dans la dynamique de formation des granules de stress et des études soulignent que ces granules pourraient représenter le mécanisme à l'origine de l'agrégation de TDP-43 (pour revue, (Dewey et al., 2012)). Les granules de stress sont des structures dynamiques qui servent à trier les ARN en condition de stress. Le destin des ARN soumis à ce mécanisme est divers et inclut leur traduction, leur séquestration au sein des granules ou leur dégradation (pour revue, (Protter et Parker, 2016)). Ainsi, il est tout à fait possible que chez les patients FTLD-TDP-GRN τ , la séquestration des ARNm de Tau puisse aboutir à une répression de leur traduction.

En parallèle, nous avons vu que les miRNA jouaient un rôle crucial durant le vieillissement normal mais également dans les maladies neurodégénératives (pour revue, (Gascon et Gao, 2012; Piscopo et al., 2016)). Récemment, des études ont indiqué que différents miRNA étaient capables de moduler l'expression des protéines Tau (Santa-Maria et al., 2015; Smith et al., 2015). Parmi eux, le miR-219 est particulièrement intéressant au regard de sa capacité à moduler la traduction de Tau tout en influençant relativement peu sur la quantité d'ARNm (Santa-Maria et al., 2015). En ce sens, il est important de rappeler que TDP-43 est aussi impliquée dans la régulation des miRNA (Kawahara et Mieda-Sato, 2012). En conséquence, une dérégulation de certains miRNA, tels que miR-219, dans le cerveau des patients FTLD-TDP-GRN τ pourrait ainsi être responsable de la diminution de Tau et conduire à la dégénérescence des neurones. Finalement, il existe actuellement un nombre croissant de preuves indiquant que la protéine Tau est physiologiquement sécrétée dans l'espace extracellulaire par plusieurs mécanismes (Dujardin et al., 2014b). Ainsi, il serait intéressant

d'évaluer la quantité de protéines Tau dans le LCR afin d'étudier si l'augmentation de la sécrétion de Tau est impliquée dans ce phénotype particulier de FTLD-TDP.

Néanmoins, il est important de souligner que la réduction des protéines Tau n'est pas décrite chez les autres groupes affectés par la pathologie TDP-43 comme les FTLD-TDP-*C9ORF72* ou encore les cas sporadiques de FTLD-TDP. En conséquence, certaines de ces hypothèses suggèrent l'implication d'un processus physiopathologique associé à TDP-43 spécifique des FTLD-TDP-*GRN* τ . C'est pourquoi une altération de la Progranuline, qui représente le principal critère de différenciation entre les FTLD-TDP-*GRN* τ et les autres FTLD-TDP, constitue une des pistes principales pour comprendre cette réduction de l'expression de Tau.

C. Et la Progranuline ?

L'ensemble des cas FTLD-TDP-*GRN* τ présentent une mutation sur le gène de la progranuline, *GRN*. Il est bien établi que les mutations *GRN* induisent une haploinsuffisance avec une réduction de 33% et 50% du niveau d'ARNm et de protéines, respectivement (Baker et al., 2006b). Cependant, le mécanisme par lequel cette haploinsuffisance aboutit au phénomène de neurodégénérescence doit encore être éclairci, et ce, notamment à cause du manque de modèles animaux pertinents de FTLD-TDP-*GRN*. La progranuline est une protéine sécrétée, exprimée de manière ubiquitaire, et qui exerce de nombreuses fonctions dont le développement tumoral et l'inflammation (pour revue, (Cenik et al., 2012; Petkau et Leavitt, 2014a)). Dans le cerveau adulte, la progranuline est principalement localisée dans les neurones et la microglie activée (Petkau et al., 2010) où elle régule la croissance neuritique (Gass et al., 2012b), l'activité synaptique (Tapia et al., 2011), la réponse à différents stress cellulaire (Almeida et al., 2012) et le fonctionnement du lysosome (Smith et al., 2012). Bien que toutes ces données soulignent un rôle important de la progranuline dans les troubles neurodégénératifs, une question subsiste : comment l'haploinsuffisance en progranuline pourrait-elle conduire à une réduction de l'expression des protéines Tau ?

Pour répondre à cette question, il est intéressant de remarquer qu'au regard des données génétiques et de la baisse d'expression de Tau, deux phénotypes distincts sont observés chez les patients FTLD-TDP-*GRN*. En effet, les cas qui présentent une délétion complète d'un des allèles du gène *GRN* ne montrent pas de diminution de Tau alors que ceux affectés par des mutations ponctuelles sont associés à une réduction considérable des 6 isoformes de Tau. Ce résultat, tout à fait unique, suggère ainsi que différentes mutations *GRN* peuvent aboutir à des phénotypes distincts, et non pas uniquement à une haploinsuffisance en progranuline. Par ailleurs, cette hypothèse est

confortée par le fait qu'une délétion homozygote du gène *GRN* ne conduit pas à un phénotype de FTLD-TDP mais à un autre trouble neurodégénératif appelé céroïde-lipofuscinose neuronale, qui est principalement caractérisé par un dysfonctionnement de la fonction lysosomale (Smith et al., 2012). En outre, une étude récente a démontré que l'expression de certaines granulines, qui résulte du clivage extracellulaire de la progranuline, pouvait favoriser la toxicité induite par TDP-43 dans un modèle de *c.elegans* (Salazar et al., 2015). De façon très intéressante, cette étude indique que ces mêmes granulines s'accumulent également dans le cerveau de patients FTLD-TDP, dans des régions cérébrales présentant une activation des astrocytes importante. Cela fait ainsi écho à nos résultats de protéomique, où une astrogliose réactive massive est observée dans le tissu cérébral des patients FTLD-TDP-*GRN* τ . En conclusion, la production de formes tronquées de la progranuline chez les patients FTLD-TDP-*GRN* τ pourrait favoriser l'expression de certaines granulines ayant un effet toxique et conduire à la neurodégénérescence. Cependant, au regard du manque d'informations sur les différentes granulines et leurs fonctions dans le SNC, établir une corrélation avec la réduction de Tau reste difficile et nécessitera d'être établie expérimentalement.

III. *Quelles sont les conséquences de la réduction de l'expression Tau au regard de ses multiples fonctions ?*

La diminution des protéines Tau chez les patients FTLD-TDP-*GRN* τ est surprenante du fait de son rôle important dans le fonctionnement neuronal. En effet, nous avons vu que Tau était bien plus qu'une simple MAP (Drechsel et al., 1992; Weingarten et al., 1975), comme le montre son implication au niveau synaptique et nucléaire (Ittner et al., 2010; Violet et al., 2014). Bien que les premières études utilisant des modèles murins déficients pour Tau ne décrivaient pas de phénotype particulier, probablement dû à la présence d'un mécanisme de compensation faisant intervenir d'autres MAP, des études récentes ont révélé que Tau était également impliquée dans la régulation de l'activité neuronale (Lei et al., 2014), du métabolisme du fer (Lei et al., 2012), de la neurogenèse (Fuster-Matanzo et al., 2012) ainsi que des processus de LTD et LTP (Ahmed et al., 2014; Kimura et al., 2014). Ainsi, il ne serait pas surprenant que la réduction dramatique des protéines Tau observée chez les patients FTLD-TDP-*GRN* τ puisse avoir des conséquences sur le fonctionnement neuronal.

Cette hypothèse est particulièrement renforcée par les résultats obtenus avec l'analyse 2D-DIGE montrant une dérégulation de l'expression de plusieurs protéines neuronales. En effet, nous avons observé une baisse importante de l'expression de protéines pré et post-synaptiques telles que

PSD-95, Munc-18, l' α -synucléine ou encore la synaptophysine dans le cerveau des patients FTLD-TDP-GRN τ en comparaison avec les autres cas de FTLD-TDP. En ce sens, il est tout à fait intéressant de noter qu'une étude récente a décrit un lien entre un dysfonctionnement synaptique et une déficience en progranuline (Lui et al., 2016). En effet, l'absence de progranuline au niveau de la microglie provoquerait une élimination des synapses par l'intermédiaire d'un dysfonctionnement lysosomal et d'une activation du complément. Ainsi, cela peut expliquer en partie l'importante altération des marqueurs synaptiques chez les patients FTLD-TDP-GRN τ , où une haploinsuffisance en progranuline est présente. Enfin, il faut aussi souligner la réduction de l'expression de la protéine DPYSL2, aussi connue sous le nom de CRMP-2 (pour *collapsin response mediator protein-2*), qui joue un rôle important dans la plasticité synaptique. Il est également intéressant de souligner que CRMP-2 et Tau sont toutes deux des protéines associées aux microtubules (Hensley et Kursula, 2016). Ces résultats démontrent ainsi que les fonctions synaptiques sont altérées dans le cerveau des patients FTLD-TDP-GRN τ .

En parallèle à ces dysfonctionnements neuronaux, une forte augmentation de l'expression de la GFAP est également observée dans le groupe FTLD-TDP-GRN τ . La GFAP appartient aux filaments intermédiaires et est exprimée principalement au sein des astrocytes. Les astrocytes sont des cellules gliales complexes et extrêmement différenciées qui participent à de nombreuses fonctions cruciales dans le SNC, incluant la plasticité synaptique et le maintien de l'homéostasie du microenvironnement neuronal (Nedergaard et al., 2003). Ces cellules gliales réagissent à différentes formes d'agression du SNC comme les infections, l'ischémie ou les maladies neurodégénératives par un mécanisme appelé astroglie réactive. L'astroglie est généralement caractérisée par une augmentation de l'expression de la GFAP (Sofroniew, 2009) qui résulte d'un changement de morphologie des astrocytes. Bien qu'une astroglie modérée représente un mécanisme protecteur, une astroglie sévère peut avoir des effets délétères sur le fonctionnement du SNC, notamment en réduisant la capacité des astrocytes à réguler l'homéostasie neuronale (Seifert et al., 2006; Sofroniew et Vinters, 2010). Partant de ce fait, il est intéressant de remarquer la diminution de l'expression de la GS dans le tissu cérébral des patients FTLD-TDP-GRN τ . En effet, cette enzyme de l'astrocyte, qui sert à convertir le glutamate en glutamine, est retrouvée fréquemment dérégulée dans des maladies neurodégénératives impliquant une altération de la protéine Tau (Hege Nilsen et al., 2013; Kulijewicz-Nawrot et al., 2013). Ainsi, nos résultats indiquent qu'une diminution de la GS pourrait perturber l'homéostasie glutamatergique et donc favoriser l'excitotoxicité au niveau synaptique chez les patients FTLD-TDP-GRN τ . Cela rejoint ainsi les résultats précédents, montrant une altération des marqueurs synaptiques. Néanmoins, de nombreuses questions restent à l'heure

Partie I : Discussion-Conclusion

actuelle sans réponse. En particulier, pourquoi l'ensemble de ces dérégulations ne se manifestent que chez les patients présentant des mutations ponctuelles du gène *GRN* ?

Dans un autre ordre d'idée, une dérégulation de l'expression de protéines associées au métabolisme glucidique a aussi été mise en évidence, suggérant un rôle critique de l'altération du métabolisme énergétique neuronal dans le processus de dégénérescence.

Perspectives

En conclusion, nos résultats révèlent que la réduction de l'expression des protéines Tau est une caractéristique spécifique des cas de FTLD-TDP portant une mutation ponctuelle sur le gène de la progranuline. Nos données suggèrent par conséquent que les FTLD-TDP-*GRN* τ pourraient représenter une sous-classe à part entière dans la classification actuelle des FTLD. De plus, les résultats obtenus en protéomique et validés par immunoempreinte montrent, qu'en plus de la baisse de Tau, les cas FTLD-TDP-*GRN* τ affichent également un dysfonctionnement synaptique et astrocytaire important qui pourrait résulter de processus physiopathologiques plus sévères. Néanmoins, nous ne sommes actuellement pas en mesure d'expliquer cette caractéristique particulière. Cela s'explique en partie par la nature des échantillons, des tissus cérébraux *post-mortem*, qui rendent l'étude de mécanismes dynamiques difficile. Ainsi, savoir si la diminution de l'expression de Tau est une conséquence ou une cause des dérégulations observées chez les patients FTLD-TDP-*GRN* τ doit encore être déterminé. Par ailleurs, le lien entre la progranuline, TDP-43 et Tau reste encore à éclaircir. Pour cela, plusieurs perspectives sont envisageables.

I. *Confirmer le lien entre la progranuline et la diminution de l'expression des protéines Tau*

La première partie de ce projet serait de valider la spécificité de la réduction de l'expression des protéines Tau dans un nombre plus important de cas FTLD-TDP-*GRN*. En effet, nos résultats semblent indiquer que cette diminution de Tau est spécifique des patients portant des **mutations ponctuelles** sur le gène *GRN*. Néanmoins, cette hypothèse se base sur la conservation des protéines Tau chez deux patients FTLD-TDP-*GRN* ayant une délétion complète d'un des deux allèles du gène *GRN*. Ainsi, accroître le nombre de cas permettrait de déterminer plus précisément quelles mutations sont spécifiquement associées à la réduction des protéines Tau. De manière similaire, étudier l'expression de Tau dans des modèles murins présentant différentes mutations de la progranuline pourrait également se révéler intéressant.

II. *Etudier les autres mécanismes pouvant moduler le niveau de protéines Tau dans le tissu cérébral*

Nos résultats montrent que ni la dérégulation du gène *MAPT* ni une augmentation de l'inclusion d'exons cryptiques au sein des ARNm de Tau ne sont responsables de la réduction des protéines Tau. Ainsi, notre étude et celles de Zhukareva suggèrent l'implication d'autres mécanismes post-transcriptionnels dans ce phénomène. Au regard de la conservation des ARNm de Tau, le blocage de la traduction représente une piste particulièrement attractive pour expliquer cette réduction de la quantité de protéines Tau. Plusieurs mécanismes liés à la traduction des ARNm pourraient être impliqués. Tout d'abord, l'altération de la traduction des ARNm de Tau pourrait résulter d'une séquestration des ARNm de Tau au sein de granules de stress. Afin de vérifier cela, il serait intéressant d'étudier la localisation des protéines impliquées dans la formation de granules de stress tel que TIA-1 (*T-cell intracytoplasmic antigen*) sur des coupes de tissus cérébraux de patients FTLD-TDP-*GRM* τ par la technique d'immunofluorescence. Cette technique, couplée à une hybridation *in situ* des ARNm de Tau, permettrait de déterminer s'il existe une co-localisation entre les ARNm de Tau et les granules de stress. De plus, la présence ou l'absence d'ARNm de Tau au niveau axonal indiquera s'il existe une altération du transport de ces ARNm dans les régions distales. Par ailleurs, TDP-43 étant impliquée dans la formation des granules de stress (McDonald et al., 2011), examiner si ces mêmes granules de stress sont immunoréactives pour TDP-43 pourrait permettre d'établir un lien direct entre la réduction des protéines Tau et TDP-43. Dans le même ordre d'idée, il serait également intéressant d'établir le profil des polysomes dans le tissu cérébral de ces patients. En effet, cette approche permet de séparer les différentes populations de ribosomes (actifs ou inactifs) et permet ainsi d'étudier la régulation de la traduction. De manière très intéressante, chaque fraction peut ensuite être analysée avec différentes techniques telles que la RT-qPCR afin de caractériser les ARNm présents. Dans le cadre de notre projet, cette approche permettrait de déterminer si les ARNm de Tau sont enrichis dans les fractions contenant les ribosomes inactifs, ce qui pourrait expliquer la réduction de la quantité de protéines. Enfin, étudier l'expression des miRNA impliqués dans la régulation de l'expression de Tau, comme miR-219 (Santa-Maria et al., 2015), permettrait de mettre en évidence si une augmentation de leur expression est responsable de la diminution des protéines Tau chez les patients FTLD-TDP-*GRM* τ .

Parallèlement à ces approches ciblant la régulation de la traduction, il serait aussi intéressant d'évaluer la quantité de protéines Tau dans le LCR des patients FTLD-TDP-*GRM* τ afin de déterminer si la sécrétion joue un rôle dans la diminution de Tau.

III. Déterminer le lien entre Tau, TDP-43 et la progranuline dans ce contexte physiopathologique particulier

Dans le cadre de ces travaux de recherche, nous avons principalement travaillé sur le tissu cérébral humain. Le tissu cérébral humain représente un outil précieux et d'une importance capitale pour la compréhension des troubles neurodégénératifs tels que les FTLD. Nos résultats montrent que la diminution de Tau est corrélée à une altération synaptique et une astrogliose réactive plus importante. Néanmoins, en se basant uniquement sur l'étude du tissu cérébral *post-mortem*, il est difficile d'établir si la réduction des protéines se positionne en amont ou en aval de ces dérégulations. Pour cela, développer des modèles *in vitro* et *in vivo* semble indispensable.

Dans ce contexte, des lignées cellulaires issues de neuroblastome humain (SH-SY5Y) et exprimant de façon inductible différentes formes de TDP-43 (TDP-WT, TDP-NESmut ou TDP-RRM1mut) ont été développées pendant ma thèse. Les formes TDP-NESmut et TDP-RRM1mut avaient pour but de mimer une perte de fonction de TDP-43 en conduisant respectivement à une séquestration de TDP-43 dans le noyau ou à un blocage des interactions entre TDP-43 et ses ARN cibles. Les SH-SY5Y n'exprimant pas la protéine Tau en phase de prolifération, l'un des objectifs était également de trouver le protocole de différenciation permettant d'obtenir une expression des protéines Tau suffisante pour pouvoir l'étudier. Plusieurs protocoles de différenciation ont ainsi été testés en utilisant le NGF et/ou l'acide rétinoïque comme agent de différenciation. Néanmoins, aucun de ces protocoles ne nous a permis d'obtenir des lignées différenciées, nous empêchant ainsi d'étudier l'effet de la perte de fonction de TDP-43 sur les protéines Tau. Pour pallier à ce problème, il serait possible d'utiliser des cultures primaires de neurones de souris exprimant la protéine Tau humaine (hTau). De plus, développer des lentivirus exprimant les différentes formes de TDP-43 citées précédemment est aussi réalisable au sein du laboratoire. L'objectif serait ainsi d'infecter les cultures primaires hTau avec nos différentes constructions afin d'étudier les conséquences sur l'expression des protéines Tau humaines. Par ailleurs, nous pourrions aussi infecter des cultures primaires de souris déficientes pour Tau et définir si l'absence de Tau influence la toxicité induite par les différentes formes de TDP-43. Pour cela, nous étudierons les modifications pathologiques de TDP-43 (troncation, phosphorylation) ainsi que l'expression de marqueurs synaptiques par immunoempreinte et/ou immunofluorescence. Enfin, il serait également intéressant d'étudier l'influence du niveau de progranuline en modulant son expression dans ces modèles (siRNA ou ajout de progranuline recombinante).

Des modèles *in vivo* pourraient aussi être envisagés. En effet, bien que les modèles murins déficients pour la progranuline ne récapitulent pas toutes les caractéristiques observées dans les FTLD, il pourrait être intéressant d'examiner l'influence d'une déficience en protéines Tau sur leur phénotype. De plus, les protéines identifiées en 2D-DIGE pourront servir de marqueurs afin de caractériser ces modèles.

IV. *Approfondir l'étude protéomique et valider les marqueurs identifiés*

L'analyse 2D-DIGE a permis de révéler une dérégulation de nombreux marqueurs dans le tissu cérébral des patients FTLD-TDP-GRN τ . Lors de notre étude, nous avons séparé les protéines en utilisant un gradient de pH compris entre 3 et 11. Ce gradient permet d'avoir une vision d'ensemble du protéome, en ne discriminant pas les protéines par rapport à leur pI. Néanmoins, des gradients plus restrictifs tels que les gradients 4-7 et 7-11 permettrait d'analyser plus en détail certaines populations de protéines. En conséquence, des modifications ou des dérégulations plus subtiles de certaines protéines pourraient être mises en évidence. En ce sens, une étude de 2D-DIGE utilisant un gradient 4-7 entre le groupe FTLD-TDP-GRN τ et FTLD-TDP τ a déjà été réalisée. De manière très intéressante, celle-ci a révélé une dérégulation de plusieurs *spots* qui devront être identifiés par spectrométrie de masse avant d'être validés par immunoempreinte dans les différents tissus cérébraux. Finalement, il serait intéressant de valider ces résultats en immunohistochimie sur des coupes de tissus cérébraux.

*Dans le cadre de cette thèse, nos travaux ont décrit une nouvelle sous-classe de FTLD-TDP-GRN caractérisée par une réduction significative des protéines Tau, une altération synaptique ainsi qu'une astroglie très importante. Néanmoins, nos études fonctionnelles sur le tissu cérébral n'ont pas encore permis de déterminer la cause de cette perte d'expression des protéines Tau et plusieurs mécanismes restent à investiguer. De plus, les approches cellulaires et animales devraient nous permettre d'identifier les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle et pré-translationnelle de Tau et de mieux comprendre le rôle de Tau, TDP et de la Progranuline dans l'étiopathogénie de cette sous-classe de FTLD. Finalement, l'analyse protéomique différentielle devrait aboutir à l'identification de potentiels biomarqueurs spécifiques à cette sous-classe qui devront être validés à la fois dans le tissu cérébral mais également dans les modèles *in vivo* et *in vitro*. L'identification de potentiels biomarqueurs et la compréhension des mécanismes de perte d'expression de Tau représentent de potentielles pistes thérapeutiques. Ce projet de recherche ouvre ainsi des perspectives fondamentales, diagnostiques mais aussi thérapeutiques.*

PARTIE II : ANALYSE PROTEOMIQUE
COMPARATIVE DES DIFFERENTES
SOUS-CLASSES DE FTLD

Résultats

Cette partie du projet consistait à étendre l'analyse de 2D-DIGE à l'ensemble des sous-classes de FTLD (FTLD-Tau, FTLD-TDP-*GRN*, FTLD-TDP-*C9ORF72*, FTLD-TDP sporadiques ou FTLD-FUS sporadiques) afin d'identifier des marqueurs ou des voies communes. Pour cela, le protéome de chaque groupe de FTLD a donc été comparé à un groupe d'individus témoins par la technique de 2D-DIGE (**Figure 28**). L'analyse transcriptomique réalisée en parallèle nécessitant une bonne conservation des ARN, un RIN supérieur ou égal à 5 a été utilisée comme principal critère pour le choix des échantillons. Chaque 2D-DIGE a été effectuée en utilisant un gradient de pH compris entre 3 et 11 pour la première dimension.

Diagnostic	Cas	Neuropathologie	Age (années)	Sexe	DPM (hr)	RIN (u.a)	Poids hémicerveau fixé (g)	Mutations
Témoin	1		73	M	10	6,6	508	
	2		70	M	31	5,6	765	
	2		69	M	6	6,9	632	
	3		60	F	28	6,8	788	
FTLD, <i>GRN</i>	4	FTLD-TDP Type A	65	F	N/A	5,9	N/A	c.619dup
	5	FTLD-TDP Type A	69	M	18,5	7	166	c.1494_1498del
	6	FTLD-TDP Type A	73	M	10	5,6	456	Complete deletion
	7	FTLD-TDP Type A	86	F	5,5	6,8	388	Complete deletion
FTLD, <i>C9ORF72</i>	8	FTLD-TDP	62	M	N/A	5,1	541	
	9	FTLD-TDP Type B	59	M	8,5	6	438	
	10	FTLD-TDP Type B	60	M	N/A	6,4	N/A	
	11	FTLD-TDP Type B	54	M	N/A	6,1	N/A	
FTLD-TDP, sporadique	12	FTLD-TDP Type A	42	M	37	5,7	684	
	13	FTLD-TDP	67	F	22	6,3	495	
	13	FTLD-TDP Type B	53	M	5	8	600	
	14	FTLD-TDP Type B	77	M	17	5,5	378	
FTLD-FUS, sporadique	15	FTLD-FUS	59	M	30	6,6	430	
	16	FTLD-FUS	44	M	11	5,7	504	
	17	FTLD-FUS	35	F	17	5,9	495	
	18	FTLD-FUS	54	M	18	4,8	424	
FTLD-Tau, <i>MAPT</i>	19	FTLD-Tau	43	M	6	4,8	N/A	P301L
	20	FTLD-Tau	65	F	30,5	3,4	315	P301L
	21	FTLD-Tau	66	M	30	5,9	N/A	P301L
	22	FTLD-Tau	85	F	21	5	360	P332S

Tableau 5 : Données démographique et neuropathologique des cas utilisés pour l'étude. MA, maladie d'Alzheimer. *C9ORF72*, chromosome 9 open reading frame 72; FTLD, frontotemporal lobar degeneration; *GRN*, progranuline; *MAPT*, microtubule-associated protein tau; DPM, délai post-mortem; RIN, RNA integrity number.

I. *FTLD-TDP-GRN vs Témoin*

Tout d'abord, nous avons comparé les protéomes du groupe FTLD-TDP-GRN en comparaison avec le groupe témoin. A la suite de l'analyse bio-informatique des gels de 2D-DIGE, 19 *spots* ont été mis en évidence comme étant différentiellement exprimés de manière significative entre le groupe FTLD-TDP-GRN et le groupe Témoin (voir **Annexe**). Parmi ces 19 *spots*, l'analyse par spectrométrie de masse n'a permis d'identifier que 5 protéines différentes (**Tableau 6**).

Spot n°	Protein Name	Accession No.	Gene Name	<i>p</i> -value	Fold change	Theoretical pI/MW	Apparent pI/MW	Mascot score	% sequence coverage
Cytoskeleton related proteins									
136	Gelsolin	P06396	<i>GSN</i>	0,002	+ 1,1	5,7/79	5,7/79	65	9,3
Metabolism related proteins									
736	Ferritin light subunit	P02792	<i>FTL</i>	0,016	+ 1,2	5,4/20	5,4/20	60,1	25,1
Astrocytic related proteins									
412	Glial fibrillary acidic protein	P14136	<i>GFAP</i>	0,0001	+ 1,6	5,3/49,8	5,3/49,8	199	46,8
Stress related proteins									
223	Heat shock 70 kDa protein 1A	P0DMV8	<i>HSPA1A</i>	0,048	- 1,1	5,4/70	5,4/70	58,8	15,3
734	Alpha-crystallin beta-chain	P02511	<i>CRYAB</i>	0,064	- 1,1	6,9/20,1	6,9/20,1	110	52

Tableau 6 : Liste des protéines différentiellement exprimées entre les groupes FTLD-TDP-GRN et Témoin. Les données obtenues à partir du logiciel SameSpot sont indiquées pour chaque *spot* d'intérêt : numéro du *spot* correspondant, *p*-value, *fold change* (FTLD-TDP-GRN vs Témoin), poids moléculaire expérimental (MW) and point isoélectrique (pI). Les informations issues de l'analyse par spectrométrie de masse sont également présentées: nom de la protéine, numéro d'accession, gène associé, score d'identification (Mascot), séquence couverte lors de l'identification (%), poids moléculaire (MW) et point isoélectrique (pI) théorique de la protéine. Un score d'identification supérieur à 61 est considéré comme pertinent. Les différences entre la valeur théorique et expérimentale du MW ou pI sont soulignées. Le nombre d'isovariants pour chaque protéine est indiqué à côté du nom de la protéine, entre parenthèse.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de la Gelsoline et de la sous-unité légère de la ferritine, des protéines impliquées respectivement dans l'assemblage de l'actine et dans l'homéostasie du fer (**Tableau 6**). En parallèle, une augmentation importante de la GFAP a été observée chez les patients FTLD-TDP-GRN (*spot* 412, + 1,6 ; **Tableau 6**). De plus, des protéines impliquées dans l'homéostasie protéique en condition de stress telles que HSP-70 et la cristalline alpha présentent une diminution significative de leur expression (**Tableau 6**). Néanmoins, seule l'augmentation de la GFAP a pu être validée lors de l'immunoempreinte sur l'ensemble des cas FTLD-TDP-GRN (**Figure 39**). En effet, l'étude de l'expression d'HSP-70 révèle une augmentation et non pas une diminution. Ces divergences entre les résultats en biochimie et protéomique peuvent notamment s'expliquer par l'importante majorité de cas FTLD-TDP-GRN τ .

En effet, nous avons vu précédemment que ces cas présentaient des dérégulations tout à fait particulières. Or, lors de l'analyse par 2D-DIGE du groupe FTLD-TDP-GRN, les tissus cérébraux de deux patients FTLD-TDP-GRN τ associés à ceux de deux patients FTLD-TDP-GRN τ (expression normale de Tau) ont été utilisés. Ainsi, il est possible que la validation par immunoempreinte sur l'ensemble des cas ne soit pas représentative des données obtenues en protéomique.

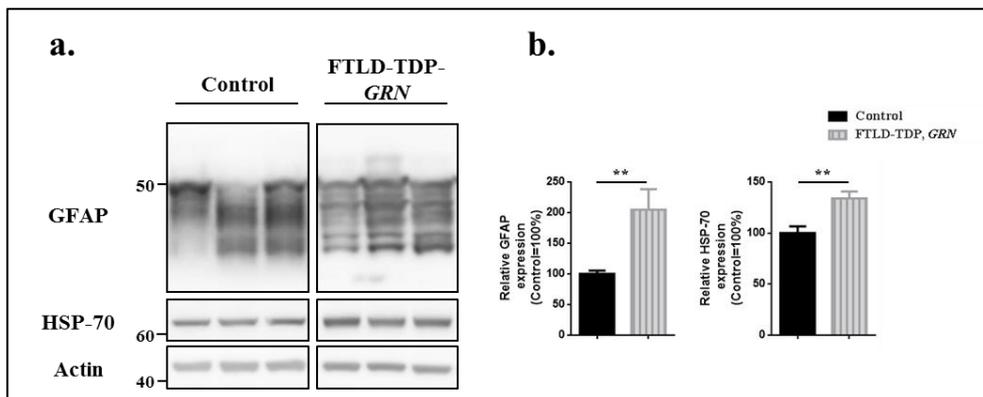


Figure 39 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-TDP-GRN par la technique d'immunoempreinte. (a) Analyse par immunoempreinte de la GFAP et d'HSP-70 dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-TDP-GRN. Données représentatives de 10 cas FTLD-TDP-GRN et 8 cas témoins. (b) L'expression des protéines a été quantifiée et normalisée par rapport à un échantillon contenant une quantité équivalente de protéines de chaque tissu cérébral témoin utilisé dans cette étude. L'Actine a servi de contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Mann-Whitney (** $p < 0.01$).

II. FTLD-TDP Sporadique vs Témoin

La comparaison entre le protéome du groupe FTLD-TDP sporadique et le groupe Témoin a mis en évidence de nombreuses dérégulations avec un total de 49 *spots* différemment exprimés entre les deux groupes (voir **Annexe**). Parmi ces 49 *spots*, l'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier 13 protéines ainsi que 2 isovariants de ces mêmes protéines.

Partie II : Résultats

Spot n°	Protein Name	Accession No.	Gene Name	<i>p</i> -value	Fold change	Theoretical pI/MW	Apparent pI/MW	Mascot score	% sequence coverage
Metabolism related proteins									
432	ATP synthase, alpha subunit	P10809	<i>ATP5A1</i>	0,018	- 1,5	9,6/59,8	9,6/59,8	40,7	19,3
538	Creatine Kinase	P1277	<i>CKB</i>	4,2E-04	- 1,9	5,2/42,9	5,2/42,9	66,4	24,4
779	Phosphoglycerate mutase 1	P18669	<i>PGAM1</i>	0,023	- 1,2	6,8/28,9	6,8/28,9	131	46,5
872	Phosphatidylethanolamine -binding protein 1	P30086	<i>PEBP1</i>	0,008	- 1,4	7,8/21,2	7,8/21,2	118	47,1
971	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	P04406	<i>GAPDH</i>	0,008	- 1,2	9,3/36,2	9,3/36,2	36,4	4,2
980	Alpha-enolase	P06733	<i>ENO1</i>	0,014	- 1,4	7,7/47,5	7,7/47,5	85,7	22,1
Astrocytic related proteins									
459	Glial fibrillary acidic protein (3)	P14136	<i>GFAP</i>	1,65E-04	+ 3,2	5,3/49,8	5,5/49,8	176	40,7
Nuclear proteins									
283	Histone H4	P62805	<i>HIST1H4A</i>	0,003	+ 1,8	11,8 /11,4	<u>6,4/70</u>	176	40,7
Stress related proteins									
350	HSP-60	P10809	<i>HSPD1</i>	0,018	- 1,5	5,6/61,2	5,2/61,2	99,3	26,4
861	Peroxiredoxin-6	P30041	<i>PRDX6</i>	0,029	- 1,2	5,6/22	5,6/22	109	29,8
Other									
764	Rho-GDP Dissociation inhibitor 1	P52565	<i>ARHGDI1</i>	3,6E-06	- 1,5	4,9/23,2	4,9/23,2	55,9	21,6
946	14-3-3 epsilon	P62258	<i>YWHAZ</i>	0,007	- 1,2	4,5/29,3	4,5/29,3	71,2	23,1
953	14-3-3 zeta/delta	P63104	<i>YWHAZ</i>	0,001	- 1,5	4,5/29,3	4,5/29,3	73	24,9

Tableau 7 : Liste des protéines différentiellement exprimées entre le groupe FTLD-TDP sporadique et Témoin. Les données obtenues à partir du logiciel SameSpot sont indiquées pour chaque *spot* d'intérêt : numéro du *spot* correspondant, *p*-value, *fold change* (FTLD-TDP Sporadique vs Témoin), poids moléculaire expérimental (MW) and point isoélectrique (pI). Les informations issues de l'analyse par spectrométrie de masse sont également présentées: nom de la protéine, numéro d'accèsion, gène associé, score d'identification (Mascot), séquence couverte lors de l'identification (%), poids moléculaire (MW) et point isoélectrique (pI) théorique de la protéine. Un score d'identification supérieur à 61 est considéré comme pertinent. Les différences entre la valeur théorique et expérimentale du MW ou pI sont soulignées. Le nombre d'isovariants pour chaque protéine est indiqué à côté du nom de la protéine, entre parenthèse.

Une sous-expression de plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme glucidique a ainsi été mise en évidence (**Tableau 7**). En outre, une augmentation très importante de la GFAP est également observée chez ces patients (spot 459, + 3,2 ; **Tableau 7**). Ce résultat est renforcé par la présence de 2 isovariants supplémentaires de la GFAP présentant également une surexpression. L'histone H4, une protéine jouant un rôle dans la structuration de l'ADN, montre aussi une

augmentation significative de son expression (spot 283, + 1,8 ; **Tableau 7**). De manière similaire au groupe FTLD-TDP-GRN, une réduction de l'expression de protéines liées à l'homéostasie protéique (HSP-60 et la peroxyrédoxine 6) est à nouveau observée (**Tableau 7**). Enfin, le groupe FTLD-TDP sporadique présente une diminution de l'expression de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, à l'image de 14-3-3 (*spots* 946 et 953; **Tableau 7**).

Afin de valider ces résultats, nous avons étudié l'expression de la GFAP et de la GAPDH dans l'ensemble des cas FTLD-TDP sporadiques et témoins. A nouveau, les résultats démontrent une augmentation significative de la GFAP chez les patients FTLD-TDP sporadiques en comparaison avec les individus témoins (**Figure 40**). En revanche, l'expression de la GAPDH est similaire entre les deux groupes, malgré la différence observée en protéomique (**Figure 40**).

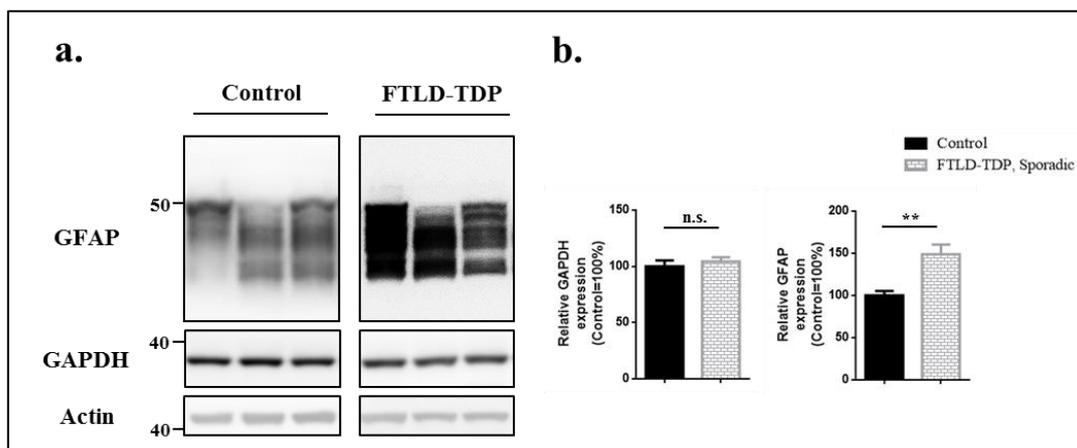


Figure 40 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-TDP Sporadiques par la technique d'immunoempreinte. (a) Analyse par immunoempreinte de la GFAP et de la GAPDH dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-TDP sporadiques. Données représentatives de 8 cas FTLD-TDP sporadiques et 8 cas témoins. (b) L'expression des protéines a été quantifiée et normalisée par rapport à un échantillon contenant une quantité équivalente de protéines de chaque tissu cérébral témoin utilisé dans cette étude. L'Actine a servi de contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Mann-Whitney (n.s, non significatif ; ** $p < 0.01$).

III. *FTLD-Tau-MAPT* vs Témoin

La comparaison des protéomes entre le groupe Témoin le groupe *FTLD-Tau-MAPT* par 2D-DIGE a permis de mettre en évidence 21 *spots* dérégulés (voir **Annexe**). A la suite de l'analyse par spectrométrie de masse, 9 protéines ont été identifiées ainsi que 4 isovariants de ces protéines.

Spot n°	Protein Name	Accession No.	Gene Name	<i>p</i> -value	Fold change	Theoretical pI/MW	Apparent pI/MW	Mascot score	% sequence coverage
Metabolism related proteins									
634	Alpha-enolase	P06733	<i>ENO1</i>	0,045	+1,3	7,7/47,5	7,7/47,5	66,4	24,4
723	Fructose-biphosphate aldolase A	P22197	<i>ALDOA</i>	0,034	-1,3	9,2/39,9	9,2/39,9	109	33,5
277	Aconitase hydratase, mitochondrial	Q99798	<i>ACO2</i>	0,042	-1,2	7,9/86,1	6,9/86,1	133	19,6
Astrocytic related proteins									
669	Glial fibrillary acidic protein (2)	P14136	<i>GFAP</i>	1,00E-04	+3,6	5,3/49,8	5,5/49,8	180	41,2
Synaptic related proteins									
Dihydropyrimidinase-related									
460	protein 2 (3)	Q16555	<i>DPYSL2</i>	0,012	-1,4	5,9/62,7	5,9/62,7	168	18,5
218	Dynamamin-1 (2)	Q05193	<i>DNMI</i>	0,012	-1,6	6,5/96,5	6,5/96,5	84,6	11,8
Stress related proteins									
419	Heat shock 70 kDa protein 1A	P0DMV8	<i>HSPA1A</i>	0,031	-1,4	5,4/70,3	5,4/70,3	190	34
985	Peroxiredoxin-6	P30041	<i>DNMI</i>	0,048	-1,4	6/25,1	6/25,1	129	58,5
Other									
429	Vesicle-fusing ATPase	P46459	<i>NSF</i>	0,034	+1,3	6,6/83,1	<u>5,7/70</u>	186	31

Tableau 8 : Liste des protéines différenciellement exprimées entre le groupe *FTLD-Tau-MAPT* et Témoin. Les données obtenues à partir du logiciel SameSpot sont indiquées pour chaque *spot* d'intérêt : numéro du *spot* correspondant, *p*-value, *fold change* (*FTLD-Tau-MAPT* vs Témoin), poids moléculaire expérimental (MW) and point isoélectrique (pI). Les informations issues de l'analyse par spectrométrie de masse sont également présentées: nom de la protéine, numéro d'accèsion, gène associé, score d'identification (Mascot), séquence couverte lors de l'identification (%), poids moléculaire (MW) et point isoélectrique (pI) théorique de la protéine. Un score d'identification supérieur à 61 est considéré comme pertinent. Les différences entre la valeur théorique et expérimentale du MW ou pI sont soulignées. Le nombre d'isovariants pour chaque protéine est indiqué à côté du nom de la protéine, entre parenthèse.

A nouveau, 3 protéines liées au métabolisme ont été mise en évidence comme différenciellement exprimées (*spots* 634, 723 et 277 ; **Tableau 8**). De plus, une hausse importante de la GFAP est également observée chez les patients *FTLD-Tau-MAPT* en comparaison avec le groupe témoin. Par ailleurs, plusieurs isovariants de deux protéines associées à la fonction synaptique (la *Dynamamin 1* et la *Dihydropyrimidinase-related protein 2*) présentent une diminution significative de leur expression (**Tableau 8**). De manière similaire aux précédents groupes, une baisse de l'expression d'HSP-70 et de la peroxyrédoxine est observée chez les patients *FTLD-Tau-MAPT* (**Tableau 8**).

Finalement, l'étude révèle aussi une augmentation de l'ATPase NSF - une protéine impliquée dans le mécanisme de fusion des vésicules - dans le groupe FTLD-Tau-MAPT (**Tableau 8**).

La GFAP ainsi que les marqueurs synaptiques étant fortement dérégulés dans le groupe FTLD-Tau-MAPT, nous avons évalué leur expression dans l'ensemble des cas en utilisant la technique d'immunoempreinte. L'augmentation importante de la GFAP a été à nouveau retrouvée chez les patients FTLD-Tau-MAPT en comparaison avec les individus témoins (**Figure 41**). En ce qui concerne les protéines synaptiques, aucune diminution significative de leur expression n'a été observée, malgré une tendance à la baisse (**Figure 41**).

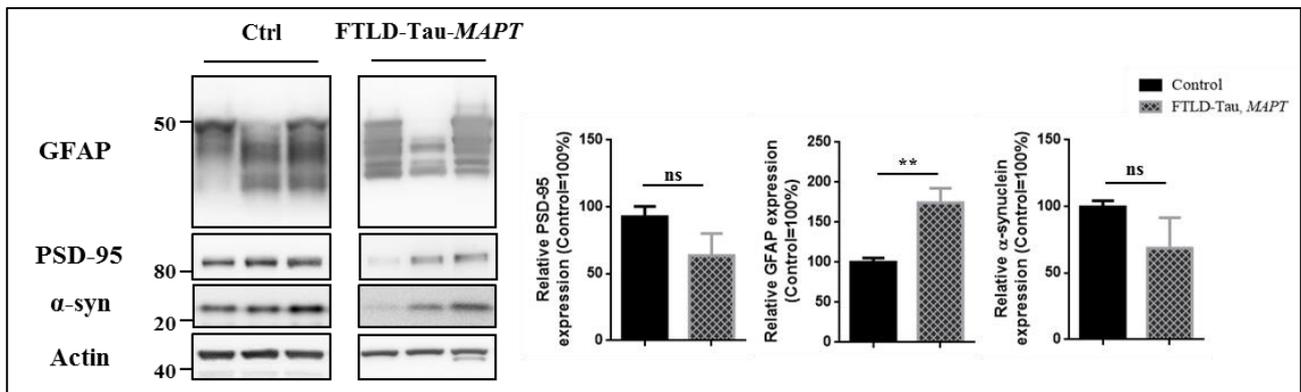


Figure 41 : Validation des résultats de 2D-DIGE dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-Tau-MAPT par la technique d'immunoempreinte. (a) Analyse par immunoempreinte de la GFAP et de la GAPDH dans le tissu cérébral des individus témoins et FTLD-Tau-MAPT. Données représentatives de 8 cas FTLD-Tau-MAPT et 8 cas témoins. (b) L'expression des protéines a été quantifiée et normalisée par rapport à un échantillon contenant une quantité équivalente de protéines de chaque tissu cérébral témoin utilisé dans cette étude. L'Actine a servi de contrôle de charge. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne ± erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée avec le test de Mann-Whitney (n.s., non significatif ; ** $p < 0.01$).

IV. *Aucun changement significatif pour les groupes FTLD-TDP-C9ORF72 et FTLD-FUS*

De manière assez inattendue, l'analyse bio-informatique des images obtenues en 2D-DIGE n'a pas permis d'identifier des *spots* dérégulés entre le groupe témoin et le groupe FTLD-C9ORF72 mais également entre le groupe témoin et FTLD-FUS (voir **Annexe**). Cela est d'autant plus surprenant pour le groupe FTLD-TDP-C9ORF72 où des différences de fluorescences sont observées (voir **Annexe**).

V. *Tableau récapitulatif*

		FTLD-TDP-GRN	FTLD-TDP sporadique	FTLD-Tau
Homéostasie protéique		HSP-70, Alpha-crystallin	Peroxyredoxin-6, HSP-60	HSP-70 , Peroxyredoxine-6
Astrocyte		GFAP	GFAP	GFAP
Métabolisme	Glycolyse		GAPDH, Alpha-Enolase, Phosphoglycerate mutase 1	Fructose-bisphosphate aldolase A, Alpha-enolase
	Fer	Ferritin light chain		
	Mitochondrie		ATP synthase, HSP-60	Aconitase hydratase
	Autres		Créatine Kinase B, Phosphatidyl-ethanolamine-binding protein 1	
Cytosquelette		Gelsoline		
Synapse				Dynamine-1 CRMP-2
Fusion vésicule				Vesicle-fusing ATPase
Noyau			Histone H4	
Signalisation			14-3-3, Rho-GDI 1	

Tableau 9 : Tableau indiquant les protéines dérégulées ainsi que leur fonction associé pour chaque groupe de FTLD. Les protéines dont l'expression est augmentée ou diminuée sont indiquées en rouge et vert, respectivement. Les études sur les groupes FTLD-TDP-C9ORF72 et FTLD-FUS n'ayant pas révélées de différence entre les protéomes, ils ne sont pas représentés dans ce tableau. FTLD, *frontotemporal lobar degeneration*; GRN, *progranuline*; TDP, *TAR DNA binding protein*.

Discussion-Conclusion

Notre étude protéomique sur l'ensemble des classes de FTLD a permis d'identifier différents groupes de protéines dérégulées, et ce, de manière plus ou moins spécifique en fonction des sous-classes. Cependant, l'absence de protéines dérégulées dans les groupes FTLD-TDP-*C9ORF72* et FTLD-FUS reste assez surprenante au regard des différences de fluorescences visibles, notamment pour le groupe FTLD-TDP-*C9ORF72*. Ainsi, il faudra probablement renouveler l'expérience ou utiliser des gradients de pH différents lors de la première dimension afin de faire ressortir ces différences.

Parmi les groupes de protéines identifiées, il n'est pas surprenant de voir que la dérégulation du métabolisme énergétique, qui est retrouvée dans de nombreuses maladies neurodégénératives, soit commune aux différentes sous-classes de FTLD. Certains groupes, à l'instar des FTLD-Tau semblent tout de même davantage affectés, notamment au niveau du métabolisme du glucose. De manière similaire, la dérégulation des facteurs impliqués dans l'homéostasie protéique n'est pas étonnante au regard des différentes protéines qui s'agrègent dans ces maladies. En effet, une altération des voies de dégradation des protéines représente une des hypothèses pour expliquer leur accumulation (Ling et al., 2013a). Néanmoins, il est intéressant de remarquer que ces facteurs sont surexprimés chez les patients FTLD-Tau-*MAPT* alors qu'ils sont retrouvés sous-exprimés chez les FTLD-TDP. Ces résultats suggèrent ainsi que l'homéostasie protéique est dérégulée de différentes manières en fonction de la pathologie. Comme l'indique l'augmentation de l'expression de la GFAP, l'astroglie est également un mécanisme partagé par l'ensemble des groupes. Bien que ce résultat était attendu du fait de la présence de lésions dans le tissu cérébral des patients, il est important de noter que l'astroglie est particulièrement importante dans le cerveau des patients FTLD-Tau-*MAPT*. Ce résultat est tout à fait intéressant puisqu'il fait écho à celui obtenu chez les patients FTLD-TDP-*GRM1* où une astroglie réactive massive identique était observée. Dans les deux cas, l'astroglie est par conséquent associée à une perte de fonction de la protéine Tau. Dans le même ordre d'idée, le groupe FTLD-Tau-*MAPT* est le seul à présenter une atteinte des marqueurs synaptiques. Cependant, ces résultats sont à modérer puisque l'altération des marqueurs synaptiques n'a pu être validée en immunoempreinte pour l'ensemble du groupe FTLD-Tau-*MAPT*.

Perspectives

L'ensemble de ces résultats a montré qu'il existait des points communs (astrogliose, dérégulation métabolique) mais également des différences d'altération du protéome entre les différentes sous-classes de FTLD. Néanmoins, il est important de remarquer qu'une partie des *spots* dérégulés n'a pu être identifiée. L'impossibilité d'identifier ces *spots* peut notamment résulter d'un manque de sensibilité lors de l'analyse MS/MS pour les *spots* qui ne sont pas fortement exprimés. Ainsi, il pourrait être utile de s'orienter vers des spectromètres de masse dotés d'une meilleure sensibilité, comme un Orbitrap, afin d'identifier les protéines exprimées plus faiblement.

En parallèle, nous avons précédemment indiqué que l'ensemble de cette étude a été effectué en utilisant un gradient de pH compris entre 3 et 11 pour la première dimension. Par conséquent, il serait intéressant de reproduire les expériences en utilisant des gradients plus restreints (4-7 ou 7-11). Cela permettrait probablement de mettre en évidence d'autres modifications des protéomes. De plus, l'étude devra être reproduite sur les groupes FTLD-TDP-*C9ORF72* et FTLD-FUS afin de s'assurer que les différences de fluorescences observées sont bien non significatives. En outre, il sera nécessaire d'obtenir les outils immunologiques adéquats afin de pouvoir valider l'ensemble des protéines identifiées.

Enfin, la partie la plus importante sera de confronter ces résultats à ceux obtenus par l'équipe d'Isabelle Le Ber afin de mettre en évidence si ces dérégulations observées en protéomique sont le reflet d'une dérégulation transcriptomique.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Blum, D., Galas, M.C., D'Hooge, R., Buee, L., et Balschun, D. (2014). Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol. Aging* *35*, 2474-2478.
- Ahmed, Z., Sheng, H., Xu, Y., Lin, W.-L., Innes, A.E., Gass, J., Yu, X., Hou, H., Chiba, S., Yamanouchi, K., et al. (2010). Accelerated Lipofuscinosis and Ubiquitination in Granulin Knockout Mice Suggest a Role for Progranulin in Successful Aging. *Am. J. Pathol.* *177*, 311-324.
- Ahmed, Z., Bigio, E.H., Budka, H., Dickson, D.W., Ferrer, I., Ghetti, B., Giaccone, G., Hatanpaa, K.J., Holton, J.L., Josephs, K.A., et al. (2013). Globular glial tauopathies (GGT): Consensus recommendations. *Acta Neuropathol.* *126*, 537-544.
- Alami, N.H., Smith, R.B., Carrasco, M.A., Williams, L.A., Winborn, C.S., Han, S.S.W., Kiskinis, E., Winborn, B., Freibaum, B.D., Kanagaraj, A., et al. (2014). Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* *81*, 536-543.
- Almeida, S., Zhang, Z., Coppola, G., Mao, W., Futai, K., Karydas, A., Geschwind, M.D., Tartaglia, M.C., Gao, F., Gianni, D., et al. (2012). Induced pluripotent stem cell models of progranulin-deficient frontotemporal dementia uncover specific reversible neuronal defects. *Cell Rep.* *2*, 789-798.
- Alonso, A.D.C., Li, B., Grundke-Iqbal, I., et Iqbal, K. (2006). Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 8864-8869.
- Alonso, a C., Grundke-Iqbal, I., et Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat. Med.* *2*, 783-787.
- Alzheimer, A. (1911). Uber eigenartige Krankheitsfalle des spateren Alters. *Zeitschrift fur die gesamte Neurol. und Psychiatr.* *4*, 356-385.
- Andrieux, A., Salin, P.A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Fauré, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., et al. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev.* *16*, 2350-2364.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., et al. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 602-611.
- Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A.M., Hut, R. a, Rüdiger, J., Van der Zee, E. a, Harkany, T., Holzer, M., et Härtig, W. (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J. Neurosci.* *23*, 6972-6981.
- Armstrong, R.A., et Cairns, N.J. (2011). A morphometric study of the spatial patterns of TDP-43 immunoreactive neuronal inclusions in frontotemporal lobar degeneration (FTLD) with progranulin (GRN) mutation. *Histol. Histopathol.* *26*, 185-190.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., et Ginzburg, I. (2001). Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J. Neurosci.* *21*,

6577-6587.

Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., Wolozin, B., Butovsky, O., Kügler, S., et Ikezu, T. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Publ. Gr.* *18*, 1584-1593.

Ash, P.E.A., Bieniek, K.F., Gendron, T.F., Caulfield, T., Lin, W.L., DeJesus-Hernandez, M., Van Blitterswijk, M.M., Jansen-West, K., Paul, J.W., Rademakers, R., et al. (2013). Unconventional Translation of C9ORF72 GGGGCC Expansion Generates Insoluble Polypeptides Specific to c9FTD/ALS. *Neuron* *77*, 639-646.

Ayala, Y.M., De Conti, L., Avendaño-Vázquez, S.E., Dhir, A., Romano, M., D'Ambrogio, A., Tollervey, J., Ule, J., Baralle, M., Buratti, E., et al. (2011). TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J.* *30*, 277-288.

B

Baborie, A., Griffiths, T.D., Jaros, E., McKeith, I.G., Burn, D.J., Richardson, A., Ferrari, R., Moreno, J., Momeni, P., Duplessis, D., et al. (2011). Pathological correlates of frontotemporal lobar degeneration in the elderly. *Acta Neuropathol.* *121*, 365-371.

Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, A.D., Rollinson, S., et al. (2006a). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* *442*, 916-919.

Baker, M., Mackenzie, I.R., Pickering-Brown, S.M., Gass, J., Rademakers, R., Lindholm, C., Snowden, J., Adamson, J., Sadovnick, a D., Rollinson, S., et al. (2006b). Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* *442*, 916-919.

Barmada, S.J., Skibinski, G., Korb, E., Rao, E.J., Wu, J.Y., et Finkbeiner, S. (2010). Cytoplasmic mislocalization of TDP-43 is toxic to neurons and enhanced by a mutation associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* *30*, 639-649.

Bateman, A., Belcourt, D., Bennett, H., Lazure, C., et Solomon, S. (1990). Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *173*, 1161-1168.

Behrouzi, R., Liu, X., Wu, D., Robinson, A.C., Tanaguchi-Watanabe, S., Rollinson, S., Shi, J., Tian, J., Hamdalla, H.H.M., Ealing, J., et al. (2016). Pathological tau deposition in Motor Neurone Disease and frontotemporal lobar degeneration associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* *4*, 33.

Belarbi, K., Burnouf, S., Fernandez-Gomez, F.-J., Laurent, C., Lestavel, S., Figeac, M., Sultan, A., Troquier, L., Leboucher, A., Caillierez, R., et al. (2011). Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol. Dis.* *43*, 486-494.

Benajiba, L., Ber, I. Le, Camuzat, A., Lacoste, M., Thomas-Anterion, C., Couratier, P., Legallic, S., Salachas, F., Hannequin, D., Decousus, M., et al. (2009). TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Ann. Neurol.* *65*, 470-474.

Bhandari, V., Giaid, A., et Bateman, A. (1993). The complementary deoxyribonucleic acid sequence, tissue distribution, and cellular localization of the rat granulin precursor. *Society* *133*.

Biernat, J., Wu, Y.-Z., Timm, T., Zheng-Fischhofer, Q., Mendelkow, E., Meijer, L., et Mandelkow, E.M. (2002). Protein Kinase MARK/PAR-1 Is Required for Neurite Outgrowth and Establishment of Neuronal Polarity. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4013-4028.

Bibliographie

- Bigio, E.H., Brown, D.F., et White, C.L. (1999). Progressive supranuclear palsy with dementia: cortical pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 359-364.
- Bodea, L.-G., Eckert, A., Ittner, L.M., Piguet, O., et Götz, J. (2016). Tau physiology and pathomechanisms in frontotemporal lobar degeneration. *J. Neurochem.* 138, 71-94.
- Boutajangout, A., Boom, A., Leroy, K., et Brion, J.P. (2004). Expression of tau mRNA and soluble tau isoforms in affected and non-affected brain areas in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* 576, 183-189.
- Boxer, A.L., et Boeve, B.F. (2007). Frontotemporal dementia treatment: current symptomatic therapies and implications of recent genetic, biochemical, and neuroimaging studies. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 21, S79-S87.
- Bozzali, M., Battistoni, V., Premi, E., Alberici, A., Giulietti, G., Archetti, S., Turla, M., Gasparotti, R., Cercignani, M., Padovani, A., et al. (2013). Structural brain signature of FTLN driven by Granulin mutation. *J. Alzheimer's Dis.* 33, 483-494.
- Braak, H., et Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82, 239-259.
- Braak, H., Thal, D.R., Ghebremedhin, E., et Del Tredici, K. (2011). Stages of the Pathologic Process in Alzheimer Disease: Age Categories From 1 to 100 Years. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 960-969.
- Bramblett, G.T., Goedert, M., Jakes, R., Merrick, S.E., Trojanowski, J.Q., et Lee, V.M.Y. (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10, 1089-1099.
- Brelstaff, J., Lashley, T., Holton, J.L., Lees, A.J., Rossor, M.N., Bandopadhyay, R., et Revesz, T. (2011). Transportin1: A marker of FTLN-FUS. *Acta Neuropathol.* 122, 591-600.
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Irwin, D.J., Grossman, M., Robinson, J.L., Toledo, J.B., Fang, L., Van Deerlin, V.M., Ludolph, A.C., Lee, V.M.Y., et al. (2014). Sequential distribution of pTDP-43 pathology in behavioral variant frontotemporal dementia (bvFTD). *Acta Neuropathol.* 127, 423-439.
- Brun, A. (1987). Frontal lobe degeneration of non-Alzheimer type. III. Regional cerebral blood flow. *Arch.Gerontol.Geriatri.* 6, 225-233.
- Brun, A., Englund, B., Gustafson, L., Passant, U., Mann, D.M., et Snowden, J.S. (1994). Clinical and Neuropathological Criteria for Frontotemporal Dementia. The Lund and Manchester Groups. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 416-418.
- Buée, L., et Delacourte, A. (1999). Comparative Biochemistry of Tau in Progressive Supranuclear Palsy, Corticobasal Degeneration, FTDP-17 and Pick's Disease. *Brain Pathol.* 9, 681-693.
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, a, et Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95-130.
- Buée-Scherrer, V., Hof, P.R., Buée, L., Leveugle, B., Vermersch, P., Perl, D.P., Olanow, C.W., et Delacourte, A. (1996). Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol.* 91, 351-359.
- Buhour, M.S., Doidy, F., Laisney, M., Pitel, A.L., de la Sayette, V., Viader, F., Eustache, F., et Desgranges, B. (2016). Pathophysiology of the behavioral variant of frontotemporal lobar degeneration: A study combining MRI and FDG-PET. *Brain Imaging Behav.* 1-13.
- Buratti, E., et Baralle, F.E. (2001). Characterization and functional implications of the RNA binding

Bibliographie

properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J. Biol. Chem.* 276, 36337-36343.

Buratti, E., Brindisi, A., Giombi, M., Tisminetzky, S., Ayala, Y.M., et Baralle, F.E. (2005). TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: an important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J. Biol. Chem.* 280, 37572-37584.

Buratti, E., De Conti, L., Stuani, C., Romano, M., Baralle, M., et Baralle, F. (2010). Nuclear factor TDP-43 can affect selected microRNA levels. *FEBS J.* 277, 2268-2281.

C

Caceres, a, et Kosik, K.S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461-463.

Caillet-Boudin, M.-L., Fernandez-Gomez, F.-J., Tran, H., Dhaenens, C.-M., Buee, L., et Sergeant, N. (2014). Brain pathology in myotonic dystrophy: when tauopathy meets spliceopathy and RNAopathy. *Front. Mol. Neurosci.* 6, 57.

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

Cairns, N.J., Grossman, M., Arnold, S.E., Burn, D.J., Jaros, E., Perry, R.H., Duyckaerts, C., Stankoff, B., Pillon, B., Skullerud, K., et al. (2004). Clinical and neuropathologic variation in neuronal intermediate filament inclusion disease. *Neurology* 63, 1376-1384.

de Calignon, A., Fox, L.M., Pitstick, R., Carlson, G.A., Bacskai, B.J., Spires-Jones, T.L., et Hyman, B.T. (2010). Caspase activation precedes and leads to tangles. *Nature* 464, 1201-1204.

Di Carlo, V., Grossi, E., Laneve, P., Morlando, M., Dini Modigliani, S., Ballarino, M., Bozzoni, I., et Caffarelli, E. (2013). TDP-43 regulates the microprocessor complex activity during in vitro neuronal differentiation. *Mol. Neurobiol.* 48, 952-963.

Casafont, I., Bengoechea, R., Tapia, O., Berciano, M.T., et Lafarga, M. (2009). TDP-43 localizes in mRNA transcription and processing sites in mammalian neurons. *J. Struct. Biol.* 167, 235-241.

Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M.J., Lasagna-Reeves, C.A., Gerson, J.E., Singh, G., Estes, D.M., Barrett, A.D.T., Dineley, K.T., Jackson, G.R., et al. (2014). Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles. *J. Neurosci.* 34, 4260-4272.

Cenik, B., Sephton, C.F., Cenik, B.K., Herz, J., et Yu, G. (2012). Progranulin: A proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 32298-32306.

Chare, L., Hodges, J.R., Leyton, C.E., McGinley, C., Tan, R.H., Kril, J.J., et Halliday, G.M. (2014). New criteria for frontotemporal dementia syndromes: clinical and pathological diagnostic implications. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 865-870.

Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., et Hirokawa, N. (1992). Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674-677.

Chen-Plotkin, A.S., Unger, T.L., Gallagher, M.D., Bill, E., Kwong, L.K., Volpicelli-Daley, L., Busch, J.I., Akle, S., Grossman, M., Van Deerlin, V., et al. (2012). TMEM106B, the risk gene for frontotemporal dementia, is regulated by the microRNA-132/212 cluster and affects progranulin

Bibliographie

pathways. *J. Neurosci.* *32*, 11213-11227.

Chesser, A.S., Pritchard, S.M., et Johnson, G.V.W. (2013). Tau clearance mechanisms and their possible role in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front. Neurol.* *4 SEP*, 1-12.

Chitramuthu, B.P., Baranowski, D.C., Kay, D.G., Bateman, A., et Bennett, H.P. (2010). Progranulin modulates zebrafish motoneuron development in vivo and rescues truncation defects associated with knockdown of Survival motor neuron 1. *Mol. Neurodegener.* *5*, 41.

Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., et al. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* *11*, 909-913.

Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R.A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., Winkler, D.T., Reichwald, J., Staufenbiel, M., et al. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9535-9540.

Clavaguera, F., Hench, J., Goedert, M., et Tolnay, M. (2015). Invited review: Prion-like transmission and spreading of tau pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *41*, 47-58.

Colombrita, C., Zennaro, E., Fallini, C., Weber, M., Sommacal, A., Buratti, E., Silani, V., et Ratti, A. (2009). TDP-43 is recruited to stress granules in conditions of oxidative insult. *J. Neurochem.* *111*, 1051-1061.

Colombrita, C., Onesto, E., Megiorni, F., Pizzuti, A., Baralle, F.E., Buratti, E., Silani, V., et Ratti, A. (2012). TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 15635-15647.

Colombrita, C., Onesto, E., Buratti, E., de la Grange, P., Gumina, V., Baralle, F.E., Silani, V., et Ratti, A. (2015). From transcriptomic to protein level changes in TDP-43 and FUS loss-of-function cell models. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* *1849*, 1398-1410.

Costessi, L., Porro, F., Iaconcig, A., et Muro, A.F. (2014). TDP-43 regulates beta-adducin (Add2) transcript stability. *RNA Biol.* *11*, 1280-1290.

Cowan, C.M., Chee, F., Shepherd, D., et Mudher, A. (2010). Disruption of neuronal function by soluble hyperphosphorylated tau in a *Drosophila* model of tauopathy. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 564-570.

Coyne, A.N., Siddegowda, B.B., Estes, P.S., Johannesmeyer, J., Kovalik, T., Daniel, S.G., Pearson, A., Bowser, R., Daniela, X., et Zarnescu, C. (2014). Neurobiology of Disease Futsch/MAP1B mRNA Is a Translational Target of TDP-43 and Is Neuroprotective in a *Drosophila* Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurosci.* *34*, 15962-15974.

Cruchaga, C., Graff, C., Chiang, H.-H., Wang, J., Hinrichs, A.L., Spiegel, N., Bertelsen, S., Mayo, K., Norton, J.B., Morris, J.C., et al. (2011). Association of TMEM106B gene polymorphism with age at onset in granulin mutation carriers and plasma granulin protein levels. *Arch. Neurol.* *68*, 581-586.

Cruts, M., Gijselinck, I., van der Zee, J., Engelborghs, S., Wils, H., Pirici, D., Rademakers, R., Vandenberghe, R., Dermaut, B., Martin, J.J., et al. (2006). Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* *442*, 920-924.

Cullen, B.R. (2004). Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res.* *102*, 3-9.

D

Bibliographie

- Van Damme, P., Van Hoecke, A., Lambrechts, D., Vanacker, P., Bogaert, E., Van Swieten, J., Carmeliet, P., Van Den Bosch, L., et Robberecht, W. (2008). Progranulin functions as a neurotrophic factor to regulate neurite outgrowth and enhance neuronal survival. *J. Cell Biol.* *181*, 37-41.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011). Expanded GGGGCC Hexanucleotide Repeat in Noncoding Region of C9ORF72 Causes Chromosome 9p-Linked FTD and ALS. *Neuron* *72*, 245-256.
- Delacourte, A., et Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* *76*, 173-186.
- Deng, H.-X., Chen, W., Hong, S.-T., Boycott, K.M., Gorrie, G.H., Siddique, N., Yang, Y., Fecto, F., Shi, Y., Zhai, H., et al. (2011). Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* *477*, 211-215.
- Derisbourg, M., Leghay, C., Chiappetta, G., Fernandez-Gomez, F.-J., Laurent, C., Demeyer, D., Carrier, S., Buée-Scherrer, V., Blum, D., Vinh, J., et al. (2015). Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci. Rep.* *5*, 9659.
- Devenney, E., Vucic, S., Hodges, J.R., et Kiernan, M.C. (2015). Motor neuron disease-frontotemporal dementia: a clinical continuum. *Expert Rev. Neurother.* *15*, 509-522.
- Dewey, C.M., Cenik, B., Sephton, C.F., Johnson, B. a, Herz, J., et Yu, G. (2012). TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key? *Brain Res.* *1462*, 16-25.
- Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C.B., et al. (2007). The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J. Clin. Invest.* *117*, 648-658.
- Dickson, D.W., Bergeron, C., Chin, S.S., Duyckaerts, C., Horoupian, D., Ikeda, K., Jellinger, K., Lantos, P.L., Lippa, C.F., Mirra, S.S., et al. (2002). Office of Rare Diseases neuropathologic criteria for corticobasal degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 935-946.
- Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., et Holzbaur, E.L.F. (2010). Differential regulation of Dynein and Kinesin motor proteins by Tau. *Science* *319*, 1086-1089.
- Dormann, D., Capell, A., Carlson, A.M., Shankaran, S.S., Rodde, R., Neumann, M., Kremmer, E., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M., et al. (2009). Proteolytic processing of TAR DNA binding protein-43 by caspases produces C-terminal fragments with disease defining properties independent of progranulin. *J. Neurochem.* *110*, 1082-1094.
- Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M.E., Mackenzie, I.R. a, Capell, A., Schmid, B., et al. (2010). ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import. *EMBO J.* *29*, 2841-2857.
- Dormann, D., Madl, T., Valori, C.F., Bentmann, E., Tahirovic, S., Abou-Ajram, C., Kremmer, E., Ansorge, O., Mackenzie, I.R.A., Neumann, M., et al. (2012). Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J.* *31*, 4258-4275.
- Drechsel, D.N., Hyman, a a, Cobb, M.H., et Kirschner, M.W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell* *3*, 1141-1154.
- Du, C.-P., Tan, R., et Hou, X.-Y. (2012). Fyn kinases play a critical role in neuronal apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation or amyloid- β peptide treatment. *CNS Neurosci. Ther.*

Bibliographie

18, 754-761.

Dubois, B., Slachevsky, A., Litvan, I., et Pillon, B. (2000). The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology* 55, 1621-1626.

Duffy, J.R. (2007). Apraxia of speech in degenerative neurologic disease. *Aphasiology* 20, 511-527.

Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., et al. (2014a). Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 1-14.

Dujardin, S., Begard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., Loyens, A., Galas, M.C., Bousset, L., Melki, R., et al. (2014b). Ectosomes: A new mechanism for non-exosomal secretion of Tau protein. *PLoS One* 9, 28-31.

E

van Eersel, J., Ke, Y.D., Gladbach, A., Bi, M., G??tz, J., Kril, J.J., et Ittner, L.M. (2011). Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PLoS One* 6.

Escourolle, R. (1958). La maladie de Pick. Etude d'ensemble et synthèse anatomo-clinique. Thèse.

E

Fallini, C., Bassell, G.J., et Rossoll, W. (2012). The ALS disease protein TDP-43 is actively transported in motor neuron axons and regulates axon outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3703-3718.

Fang, Y.-S., Tsai, K.-J., Chang, Y.-J., Kao, P., Woods, R., Kuo, P.-H., Wu, C.-C., Liao, J.-Y., Chou, S.-C., Lin, V., et al. (2014). Full-length TDP-43 forms toxic amyloid oligomers that are present in frontotemporal lobar dementia-TDP patients. *Nat. Commun.* 5, 4824.

Feiler, M.S., Strobel, B., Freischmidt, A., Helferich, A.M., Kappel, J., Brewer, B.M., Li, D., Thal, D.R., Walther, P., Ludolph, A.C., et al. (2015). TDP-43 is intercellularly transmitted across axon terminals. *J. Cell Biol.* 211, 897-911.

Fernandez-Gomez, F.-J., Jumeau, F., Derisbourg, M., Burnouf, S., Tran, H., Eddarkaoui, S., Obriot, H., Dutoit-Lefevre, V., Deramecourt, V., Mitchell, V., et al. (2014). Consensus brain-derived protein, extraction protocol for the study of human and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting. *J. Vis. Exp.* 3, 1-8.

Ferrer, I., Santpere, G., et Van Leeuwen, F.W. (2008). Argrophilic grain disease. *Brain* 131, 1416-1432.

Fiesel, F.C., Schurr, C., Weber, S.S., et Kahle, P.J. (2011). TDP-43 knockdown impairs neurite outgrowth dependent on its target histone deacetylase 6. *Mol. Neurodegener.* 6, 64.

Finch, N., Hunter, T., Sengdy, P., et Seeley, W.W. (2010). TMEM106B regulates progranulin levels and the penetrance of FTL in GRN mutation carriers.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., et Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.

Bibliographie

- Flach, K., Hilbrich, I., Schiffmann, A., Gärtner, U., Krüger, M., Leonhardt, M., Waschipky, H., Wick, L., Arendt, T., et Holzer, M. (2012). Tau Oligomers Impair Artificial Membrane Integrity and Cellular Viability * □. 287, 43223-43233.
- Flament, S., Delacourte, A., Hemon, B., et Defossez, A. (1989). Characterization of two pathological Tau protein variants in Alzheimer brain cortices. *J. Neurol. Sci.* 92, 133-141.
- Forman, M.S., Farmer, J., Johnson, J.K., Clark, C.M., Arnold, S.E., Coslett, H.B., Chatterjee, A., Hurtig, H.I., Karlawish, J.H., Rosen, H.J., et al. (2006). Frontotemporal dementia: Clinicopathological correlations. *Ann. Neurol.* 59, 952-962.
- Freibaum, B.D., Chitta, R.K., High, A.A., et Taylor, J.P. (2010). Global analysis of TDP-43 interacting proteins reveals strong association with RNA splicing and translation machinery. *J. Proteome Res.* 9, 1104-1120.
- Freischmidt, A., Müller, K., Ludolph, A.C., et Weishaupt, J.H. (2013). Systemic dysregulation of TDP-43 binding microRNAs in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 1, 42.
- Fuentealba, R.A., Udan, M., Bell, S., Wegorzewska, I., Shao, J., Diamond, M.I., Weihl, C.C., et Baloh, R.H. (2010). Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43. *J. Biol. Chem.* 285, 26304-26314.
- Fujioka, S., et Wszolek, Z.K. (2011). Clinical aspects of familial forms of frontotemporal dementia associated with parkinsonism. *J. Mol. Neurosci.* 45, 359-365.
- Furukawa, Y., Kaneko, K., et Nukina, N. (2011). Molecular properties of TAR DNA binding protein-43 fragments are dependent upon its cleavage site. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1812, 1577-1583.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J., et Hernández, F. (2012). Tau protein and adult hippocampal neurogenesis. *Front. Neurosci.* 6, 1-6.

G

- Gallagher, M.D., Suh, E., Grossman, M., Elman, L., McCluskey, L., Van Swieten, J.C., Al-Sarraj, S., Neumann, M., Gelpi, E., Ghetti, B., et al. (2014). TMEM106B is a genetic modifier of frontotemporal lobar degeneration with C9orf72 hexanucleotide repeat expansions. *Acta Neuropathol.* 127, 407-418.
- Gans, A. (1925). *De Ziekten van Pick en van Alzheimer*. Ned. Tijdschr. v Geneesk.
- Gao, X., Joselin, A.P., Wang, L., Kar, A., Ray, P., Bateman, A., Goate, A.M., et Wu, J.Y. (2010). Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3beta. *Protein Cell* 1, 552-562.
- Gascon, E., et Gao, F.B. (2012). Cause or effect: Misregulation of microRNA pathways in neurodegeneration. *Front. Neurosci.* 6, 1-10.
- Gass, J., Prudencio, M., Stetler, C., et Petrucelli, L. (2012a). Progranulin: An emerging target for FTLT therapies. *Brain Res.* 1462, 118-128.
- Gass, J., Lee, W.C., Cook, C., Finch, N., Stetler, C., Jansen-West, K., Lewis, J., Link, C.D., Rademakers, R., Nykjær, A., et al. (2012b). Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Mol. Neurodegener.* 7, 33.
- Gelpi, E., Troakes, C., Arzberger, T., Leisser, I., Kretschmar, H., Budka, H., Kovacs, G.G., Rozemuller, A.J.M., Swieten, J.C. Van, Gelpi, E., et al. (2013). Neuropathology of the

Bibliographie

hippocampus in FTLT-Tau with Pick bodies : a study of the BrainNet. 166-178.

Gendron, T.F., Cosio, D.M., et Petrucelli, L. (2013). c9RAN translation: a potential therapeutic target for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 991-995.

Ghoshal, N., Dearborn, J.T., Wozniak, D.F., et Cairns, N.J. (2012). Core features of frontotemporal dementia recapitulated in progranulin knockout mice. *Neurobiol. Dis.* 45, 395-408.

Gitler, A.D., et Tsuiji, H. (2016). There has been an awakening: Emerging mechanisms of C9orf72 mutations in FTD/ALS. *Brain Res.* 1647, 1-11.

Gliebus, G., Bigio, E.H., Gasho, K., Mishra, M., Caplan, D., Mesulam, M.M., et Geula, C. (2010). Asymmetric TDP-43 distribution in primary progressive aphasia with progranulin mutation. *Neurology* 74, 1607-1610.

Goedert, M., et Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225-4230.

Gong, C., Singh, T.J., Gmndke-iqbal, I., et Iqbal, K. (1993). Phosphoprotein Phosphatase Activities in Alzheimer Disease Brain.

Gordon, E., Rohrer, J.D., et Fox, N.C. (2016). Advances in neuroimaging in frontotemporal dementia. *J. Neurochem.* 138, 193-210.

Gorno-Tempini, M.L., Ogar, J.M., Brambati, S.M., Wang, P., Jeong, J.H., Rankin, K.P., Dronkers, N.F., et Miller, B.L. (2006). Correlates of early mutism in progressive nonfluent aphasia. *Neurology* 67, 1849-1851.

Gorno-Tempini, M.L., Brambati, S.M., Ginex, V., Ogar, J., Dronkers, N.F., Marcone, A., Perani, D., Garibotto, M.D., Cappa, S.F., et Miller, B.L. (2008). The logopenic / phonological variant of primary progressive aphasia. *Neurology* 71, 1227-1234.

Gorno-Tempini, M.L., Hillis, A.E., Weintraub, S., Kertesz, A., Mendez, M., Cappa, S.F., Ogar, J.M., Rohrer, J.D., Black, S., Boeve, B.F., et al. (2011). Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 76, 1006-1014.

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., et Wisniewski, H.M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. ...* 261, 6084-6089.

Guillozet-Bongaarts, A.L., Cahill, M.E., Cryns, V.L., Reynolds, M.R., Berry, R.W., et Binder, L.I. (2006). Pseudophosphorylation of tau at serine 422 inhibits caspase cleavage: In vitro evidence and implications for tangle formation in vivo. *J. Neurochem.* 97, 1005-1014.

Guo, A., Tapia, L., Bamji, S.X., Cynader, M.S., et Jia, W. (2010). Progranulin deficiency leads to enhanced cell vulnerability and TDP-43 translocation in primary neuronal cultures. *Brain Res.* 1366, 1-8.

H

Hans, F., Fiesel, F.C., Strong, J.C., Jackel, S., Rasse, T.M., Geisler, S., Springer, W., Schulz, J.B., Voigt, A., et Kahle, P.J. (2014). UBE2E ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitin isopeptidase y regulate TDP-43 protein ubiquitination. *J. Biol. Chem.* 289, 19164-19179.

Harada, a, Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., et Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice

Bibliographie

lacking tau protein. *Nature* 369, 488-491.

Hasegawa, M., Arai, T., Nonaka, T., Kametani, F., Yoshida, M., Hashizume, Y., Beach, T.G., Buratti, E., Baralle, F., Morita, M., et al. (2008). Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 64, 60-70.

Hata, Y., Slaughter, C.A., et Südhof, T.C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347-351.

Hatanpaa, K.J., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Womack, K.B., Weintraub, S., Morris, J.C., Foong, C., Xiao, G., Hladik, C., Mantanona, T.Y., et al. (2008). TAR DNA-binding protein 43 immunohistochemistry reveals extensive neuritic pathology in FTL-DU: a midwest-southwest consortium for FTL-DU study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 271-279.

Hebron, M.L., Lonskaya, I., Sharpe, K., Weerasinghe, P.P.K., Algarzae, N.K., Shekoyan, A.R., et Moussa, C.E.H. (2013). Parkin ubiquitinates tar-DNA binding protein-43 (TDP-43) and promotes its cytosolic accumulation via interaction with histone deacetylase 6 (HDAC6). *J. Biol. Chem.* 288, 4103-4115.

Hege Nilsen, L., Rae, C., Ittner, L.M., Götz, J., et Sonnewald, U. (2013). Glutamate metabolism is impaired in transgenic mice with tau hyperphosphorylation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 684-691.

Hensley, K., et Kursula, P. (2016). Collapsin Response Mediator Protein-2 (CRMP2) is a plausible etiological factor and potential therapeutic target in Alzheimer's disease: Comparison and contrast with microtubule-associated protein tau. *J. Alzheimer's Dis.* 53, 1-14.

Higashi, S., Kabuta, T., Nagai, Y., Tsuchiya, Y., Akiyama, H., et Wada, K. (2013). TDP-43 associates with stalled ribosomes and contributes to cell survival during cellular stress. *J. Neurochem.*

Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., et Martin, D.W. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1381-1388.

Hodges, J.R., et Patterson, K. (2007). Semantic dementia : a unique clinicopathological syndrome. 6, 3-8.

Hodges, J.R., Patterson, K., Oxbury, S., et Funnel, E. (1992). Semantic dementia. Progressive fluent aphasia with temporal lobe atrophy. *Brain* 115, 1783-1806.

Hodges, J.R., Davies, R., Xuereb, J., Kril, J., et Halliday, G. (2003). Survival in frontotemporal dementia. *Neurology* 61, 349-354.

Holm, I.E., Isaacs, A.M., et MacKenzie, I.R.A. (2009). Absence of FUS-immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene. *Acta Neuropathol.* 118, 719-720.

Holmes, B.B., DeVos, S.L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M.O., Brodsky, F.M., Marasa, J., Bagchi, D.P., et al. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3138-47.

Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, a, et al. (1998). Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914-1917.

Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.L., et al. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067-1081.

Bibliographie

- Horowitz, P., Patterson, K., Guillozet-Bongaarts, A., Reynolds, M., Carroll, C., Weintraub, S., Bennett, D., Cryns, V., Berry, R., et Binder, L. (2004). Early N-Terminal Changes and Caspase-6 Cleavage of Tau in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* *24*, 7895-7902.
- Hsiung, G.Y.R., DeJesus-Hernandez, M., Feldman, H.H., Sengdy, P., Bouchard-Kerr, P., Dwosh, E., Butler, R., Leung, B., Fok, A., Rutherford, N.J., et al. (2012). Clinical and pathological features of familial frontotemporal dementia caused by C9ORF72 mutation on chromosome 9p. *Brain* *135*, 709-722.
- Hu, F., Padukkavidana, T., V??gter, C.B., Brady, O.A., Zheng, Y., Mackenzie, I.R., Feldman, H.H., Nykjaer, A., et Strittmatter, S.M. (2010). Sortilin-mediated endocytosis determines levels of the frontotemporal dementia protein, progranulin. *Neuron* *68*, 654-667.
- Huang, C., Bose, J.K., Majumder, P., Lee, K., Huang, J.J., Huang, J.K., et Shen, C.J. (2014). Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43. *1*, 3024-3038.
- Huey, E.D., Karen, T., Putnam, M., et Grafman, J. (2006). A systematic review of neurotransmitter deficits and treatments in frontotemporal dementia. *Neurology* *66*, 17-22.
- Huey, E.D., Ferrari, R., Moreno, J.H., Jensen, C., Morris, C.M., Potocnik, F., Kalaria, R.N., Tierney, M., Wassermann, E.M., Hardy, J., et al. (2012). FUS and TDP43 genetic variability in FTD and CBS. *Neurobiol. Aging* *33*, 9-17.
- Hulme, C., Wright, J., Crocker, T., Oluboyede, Y., et House, A. (2009). Non-pharmacological approaches for dementia that informal carers might try or access: A systematic review. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* *25*, 756-763.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, a, Grover, a, et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* *393*, 702-705.

I

- Iba, M., Guo, J.L., McBride, J.D., Zhang, B., Trojanowski, J.Q., et Lee, V.M. (2013). Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy. *J Neurosci* *33*, 1024-1037.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Xu, Y., Truax, A.C., Uryu, K., Neumann, M., Clark, C.M., Elman, L.B., Miller, B.L., Grossman, M., et al. (2008). Enrichment of C-terminal fragments in TAR DNA-binding protein-43 cytoplasmic inclusions in brain but not in spinal cord of frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Pathol.* *173*, 182-194.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Chen-Plotkin, A., Winton, M.J., Unger, T.L., Xu, Y., Neumann, M., Trojanowski, J.Q., et Lee, V.M.-Y. (2009). Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J. Biol. Chem.* *284*, 8516-8524.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Lee, E.B., Chen-Plotkin, A., Swanson, E., Unger, T., Malunda, J., Xu, Y., Winton, M.J., Trojanowski, J.Q., et al. (2011). Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 726-738.
- Iguchi, Y., Katsuno, M., Takagi, S., Ishigaki, S., Niwa, J. ichi, Hasegawa, M., Tanaka, F., et Sobue, G. (2012). Oxidative stress induced by glutathione depletion reproduces pathological modifications of TDP-43 linked to TDP-43 proteinopathies. *Neurobiol. Dis.* *45*, 862-870.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I. a, et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in

Alzheimer's disease mouse models. *Cell* *142*, 387-397.

J

Jackson, M., Lennox, G., et Lowe, J. (1996). Motor neurone disease-inclusion dementia. *Neurodegeneration* *5*, 339-350.

Jin, Y., Elalaf, H., Watanabe, M., Tamaki, S., Hineno, S., Matsunaga, K., Woltjen, K., Kobayashi, Y., Nagata, S., Ikeya, M., et al. (2015). Mutant *idh1* dysregulates the differentiation of mesenchymal stem cells in association with gene-specific histone modifications to cartilage- and bone-related genes. *PLoS One* *10*, 1-15.

Johnson, J., Diehl, J., Mendez, M., Neuhaus, J., Shapira, J., Forman, M., Chute, D., Roberson, E.D., Pace-Savitsky, C., Neumann, M., et al. (2005). Frontotemporal lobar degeneration: demographic characteristics of 353 patients. *Arch. Neurol.* *62*, 925-930.

Johnson, M.A., Vidoni, S., Durigon, R., Pearce, S.F., Rorbach, J., He, J., Brea-Calvo, G., Minczuk, M., Reyes, A., Holt, I.J., et al. (2014). Amino acid starvation has opposite effects on mitochondrial and cytosolic protein synthesis. *PLoS One* *9*.

Josephs, K.A., Duffy, J.R., Strand, E.A., Whitwell, J.L., Layton, K.F., Parisi, J.E., Hauser, M.F., Witte, R.J., Boeve, B.F., Knopman, D.S., et al. (2006). Clinicopathological and imaging correlates of progressive aphasia and apraxia of speech. 1385-1398.

Josephs, K.A., Stroh, A., Dugger, B., et Dickson, D.W. (2009). Evaluation of subcortical pathology and clinical correlations in FTL-DU subtypes. *Acta Neuropathol.* *118*, 349-358.

Josephs, K. a, Ahmed, Z., Katsuse, O., Parisi, J.F., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Petersen, R.C., Davies, P., Duara, R., Graff-Radford, N.R., et al. (2007). Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with progranulin gene (PGRN) mutations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *66*, 142-151.

Ju, J.S., et Weihl, C.C. (2010). Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and frontotemporal dementia: A disorder of autophagy. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 38-45.

K

Kabashi, E., Valdmanis, P.N., Dion, P., Spiegelman, D., McConkey, B.J., Vande Velde, C., Bouchard, J.-P., Lacomblez, L., Pochigaeva, K., Salachas, F., et al. (2008). TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* *40*, 572-574.

Kametani, F., Nonaka, T., Suzuki, T., Arai, T., Dohmae, N., Akiyama, H., et Hasegawa, M. (2009). Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *382*, 405-409.

Kanaan, N.M., Morfini, G.A., LaPointe, N.E., Pigino, G.F., Patterson, K.R., Song, Y., Andreadis, A., Fu, Y., Brady, S.T., et Binder, L.I. (2011). Pathogenic Forms of Tau Inhibit Kinesin-Dependent Axonal Transport through a Mechanism Involving Activation of Axonal Phosphotransferases. *J. Neurosci.* *31*, 9858-9868.

Kawahara, Y., et Mieda-Sato, A. (2012). TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3347-3352.

Kertesz, A., Davidson, W., McCabe, P., Takagi, K., et Munoz, D. (2003). Primary progressive

Bibliographie

aphasia : Diagnosis , varieties , evolution. 710-719.

Kim, H.-J., Raphael, A.R., LaDow, E.S., McGurk, L., Weber, R.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Finkbeiner, S., Gitler, A.D., et Bonini, N.M. (2014). Therapeutic modulation of eIF2 α phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat. Genet.* 46, 152-160.

Kimura, T., Whitcomb, D.J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., et al. (2014). Depression in the hippocampus Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. 369.

King, O.D., Gitler, A.D., et Shorter, J. (2012). The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res.* 1462, 61-80.

Kleinberger, G., Wils, H., Ponsaerts, P., Joris, G., Timmermans, J.P., Van Broeckhoven, C., et Kumar-Singh, S. (2010). Increased caspase activation and decreased TDP-43 solubility in progranulin knockout cortical cultures. *J. Neurochem.* 735-747.

Knops, J., Kosik, K.S., Lee, G., Pardee, J.D., Cohen-Gould, L., et McConlogue, L. (1991). Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J. Cell Biol.* 114, 725-733.

Kocerha, J., Kouri, N., Baker, M., Finch, N., DeJesus-Hernandez, M., Gonzalez, J., Chidamparam, K., Josephs, K.A., Boeve, B.F., Graff-Radford, N.R., et al. (2011). Altered microRNA expression in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology caused by progranulin mutations. *BMC Genomics* 12, 527.

Konzack, S., Thies, E., Marx, A., Mandelkow, E.-M., et Mandelkow, E. (2007). Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *J. Neurosci.* 27, 9916-9927.

Kovacs, G.G., Murrell, J.R., Horvath, S., Haraszti, L., Majtenyi, K., Molnar, M.J., Budka, H., Ghetti, B., et Spina, S. (2009). TARDBP Variation Associated with Frontotemporal Dementia, Supranuclear Gaze Palsy, and Chorea Gabor. *Mov. Disord.* 24, 1843-1847.

Kovacs, G.G., van der Zee, J., Hort, J., Kristoferitsch, W., Leitha, T., Höftberger, R., Ströbel, T., Van Broeckhoven, C., et Matej, R. (2016). Clinicopathological description of two cases with SQSTM1 gene mutation associated with frontotemporal dementia. *Neuropathology* 36, 27-38.

Kretzschmar, H.A., Rademakers, Æ.R., Baker, M., et Mackenzie, Æ.I.R.A. (2009). Abundant FUS-immunoreactive pathology in neuronal intermediate filament inclusion disease. 605-616.

Kulijewicz-Nawrot, M., Syková, E., Chvátal, A., Verkhratsky, A., et Rodríguez, J.J. (2013). Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer's disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro* 5, 273-282.

Kumfor, F., et Piguet, O. (2012). Disturbance of emotion processing in frontotemporal dementia: A synthesis of cognitive and neuroimaging findings. *Neuropsychol. Rev.* 22, 280-297.

Kwiatkowski, T.J., Bosco, D.A., LeClerc, A.L., Tamrazian, E., Vanderburg, C.R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E.J., Munsat, T., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* (80-). 323, 1025-2108.

L

Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K.R., Vu, A.Q., Baughn, M., Huelga, S.C., Clutario, K.M., Ling, S.-C., Liang, T.Y., Mazur, C., et al. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins

Bibliographie

- FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nat. Neurosci.* *15*, 1488-1497.
- Laird, A.S., van Hoecke, A., De Muynck, L., Timmers, M., van den Bosch, L., Van Damme, P., et Robberecht, W. (2010). Progranulin is neurotrophic in vivo and protects against a mutant TDP-43 induced axonopathy. *PLoS One* *5*, 1-7.
- Lang, C.M., Fellerer, K., Schwenk, B.M., Kuhn, P.H., Kremmer, E., Edbauer, D., Capell, A., et Haass, C. (2012). Membrane orientation and subcellular localization of transmembrane protein 106B (TMEM106B), a major risk factor for frontotemporal lobar degeneration. *J. Biol. Chem.* *287*, 19355-19365.
- Lashley, T., Rohrer, J.D., Mead, S., et Revesz, T. (2015). Review: An update on clinical, genetic and pathological aspects of frontotemporal lobar degenerations. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *41*, 858-881.
- Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F.-J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., Demeyer, D., Caillierez, R., Zommer, N., Vallez, E., et al. (2013). Detrimental effects of diet-induced obesity on τ pathology are independent of insulin resistance in τ transgenic mice. *Diabetes* *62*, 1681-1688.
- Lee, G., et Neve, R. (1989). The Microtubule of Tau Protein Binding Domain. *2*, 1615-1624.
- Lee, B.-H., Lee, M.J., Park, S., Oh, D.-C., Elsasser, S., Chen, P.-C., Gartner, C., Dimova, N., Hanna, J., Gygi, S.P., et al. (2010). Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14. *Nature* *467*, 179-184.
- Lee, E.B., Lee, V.M.-Y., et Trojanowski, J.Q. (2012). Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 38-50.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., et Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J. Cell Sci.* *111* (Pt 2, 3167-3177.
- Lee, S., Lee, T. a, Lee, E., Kang, S., Park, A., Kim, S.W., Park, H.J., Yoon, J.-H., Ha, S.-J., Park, T., et al. (2015). Identification of a subnuclear body involved in sequence-specific cytokine RNA processing. *Nat. Commun.* *6*, 5791.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415-419.
- Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D.I., Spoerri, L., Ciccotosto, G.D., Wright, D.K., Wong, B.X.W., Adlard, P. a, Cherny, R. a, Lam, L.Q., et al. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat. Med.* *18*, 291-295.
- Lei, P., Ayton, S., Moon, S., Zhang, Q., Volitakis, I., Finkelstein, D.I., et Bush, A.I. (2014). Motor and cognitive deficits in aged tau knockout mice in two background strains. *Mol. Neurodegener.* *9*, 29.
- Leroy, O., Wang, J., Maurage, C.A., Parent, M., Cooper, T., Buée, L., Sergeant, N., Andreadis, A., et Caillet-Boudin, M.L. (2006). Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* *1762*, 460-467.
- Li, B., Chohan, M.O., Grundke-Iqbal, I., et Iqbal, K. (2007). Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol.* *113*, 501-511.
- Li, H.Y., Yeh, P.A., Chiu, H.C., Tang, C.Y., et Tu, B.P. hsien (2011). Hyperphosphorylation as a defense mechanism to reduce TDP-43 aggregation. *PLoS One* *6*.
- Liachko, N.F., McMillan, P.J., Guthrie, C.R., Bird, T.D., Leverenz, J.B., et Kraemer, B.C. (2013). CDC7 inhibition blocks pathological TDP-43 phosphorylation and neurodegeneration. *Ann. Neurol.*

Bibliographie

- Liachko, N.F., McMillan, P.J., Strovass, T.J., Loomis, E., Greenup, L., Murrell, J.R., Ghetti, B., Raskind, M.A., Montine, T.J., Bird, T.D., et al. (2014). The Tau Tubulin Kinases TTBK1/2 Promote Accumulation of Pathological TDP-43. *PLoS Genet.* *10*.
- Ling, J.P., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., et Wong, P.C. (2015). TDP-43 repression of nonconserved cryptic exons is compromised in ALS-FTD. *Science* (80-.). *349*, 650-655.
- Ling, S., Polymenidou, M., et Cleveland, D.W. (2013a). Review Converging Mechanisms in ALS and FTD : Disrupted RNA and Protein Homeostasis. *Neuron* *79*, 416-438.
- Ling, S.C., Polymenidou, M., et Cleveland, D.W. (2013b). Converging mechanisms in als and FTD: Disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* *79*, 416-438.
- Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., et Gong, C.X. (2002a). Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* *115*, 829-837.
- Liu, R., Yang, G., Nonaka, T., Arai, T., Jia, W., et Cynader, M.S. (2013). Reducing TDP-43 aggregation does not prevent its cytotoxicity. *Acta Neuropathol. Commun.* *1*, 49.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H. a, Liu, Z., et Lansbury, P.T. (2002b). The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* *111*, 209-218.
- Liu-Yesucevitz, L., Bassell, G.J., Gitler, a. D., Hart, a. C., Klann, E., Richter, J.D., Warren, S.T., et Wolozin, B. (2011). Local RNA Translation at the Synapse and in Disease. *J. Neurosci.* *31*, 16086-16093.
- Livak, K.J., et Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. *Methods* *25*, 402-408.
- Lomen-Hoerth, C., Anderson, T., et Miller, B. (2002). The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* *59*, 1077-1079.
- Loomis, P. a, Howard, T.H., Castleberry, R.P., et Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 8422-8426.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., Binder, L.I., LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., et Binder, L.I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 10369-10373.
- Lourenco, G.F., Janitz, M., Huang, Y., et Halliday, G.M. (2015). Long noncoding RNAs in TDP-43 and FUS/TLS-related frontotemporal lobar degeneration (FTLD). *Neurobiol. Dis.* *82*, 445-454.
- Low, P. (2011). The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. *Gen. Comp. Endocrinol.* *172*, 39-43.
- Lu, Y., He, H.J., Zhou, J., Miao, J.Y., Lu, J., He, Y.G., Pan, R., Wei, Y., Liu, Y., et He, R.Q. (2013). Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection. *J. Alzheimer's Dis.* *37*, 551-563.
- Lui, H., Zhang, J., Makinson, S.R., Paz, J.T., Barres, B.A., Huang, E.J., Lui, H., Zhang, J., Makinson, S.R., Cahill, M.K., et al. (2016). Progranulin deficiency promotes circuit-specific synaptic pruning by microglia via complement activation. *Cell* *165*, 921-935.
- Lukavsky, P.J., Daujotyte, D., Tollervey, J.R., Ule, J., Stuani, C., Buratti, E., Baralle, F.E., Damberger, F.F., et Allain, F.H.-T. (2013). Molecular basis of UG-rich RNA recognition by the

human splicing factor TDP-43. *Nat. Publ. Gr.* 20, 1443-1449.

M

Mackenzie, I.R.A. (2007). The neuropathology and clinical phenotype of FTD with progranulin mutations. *Acta Neuropathol.* 114, 49-54.

Mackenzie, I.R.A., et Neumann, M. (2016). Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J. Neurochem.* 1-17.

Mackenzie, I.R.A., Shi, J., Shaw, C.L., DuPlessis, D., Neary, D., Snowden, J.S., et Mann, D.M.A. (2006). Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta Neuropathol.* 112, 551-559.

Mackenzie, I.R.A., Foti, D., Woulfe, J., et Hurwitz, T.A. (2008). Atypical frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive, TDP-43-negative neuronal inclusions. *Brain* 131, 1282-1293.

Mackenzie, I.R.A., Neumann, M., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G.G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I.E., et al. (2009). Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: Consensus recommendations. *Acta Neuropathol.* 117, 15-18.

Mackenzie, I.R.A., Neumann, M., Baborie, A., Sampathu, D.M., Du Plessis, D., Jaros, E., Perry, R.H., Trojanowski, J.Q., Mann, D.M.A., et Lee, V.M.Y. (2011). A harmonized classification system for FTLTDP pathology. *Acta Neuropathol.* 122, 111-113.

Mackenzie, I.R.A., Munoz, D.G., Kusaka, H., Yokota, O., Ishihara, K., Roeber, S., Kretzschmar, H.A., Cairns, N.J., et Neumann, M. (2011). Distinct pathological subtypes of FTLTDP-FUS. *Acta Neuropathol.* 121, 207-218.

Mackenzie, I.R.A., Frick, P., et Neumann, M. (2014). The neuropathology associated with repeat expansions in the C9ORF72 gene. 347-357.

Mackenzie, I.R.A., Frick, P., Grässer, F.A., Gendron, T.F., Petrucelli, L., Cashman, N.R., Edbauer, D., et Kremmer, E. (2015). Quantitative analysis and clinico - pathological correlations of different dipeptide repeat protein pathologies in C9ORF72 mutation carriers. *Acta Neuropathol.* 130, 845-861.

Mackenzie, I.R. a, Neumann, M., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G.G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I.E., et al. (2010). Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol.* 119, 1-4.

Macnair, L., Xiao, S., Miletic, D., Ghani, M., Julien, J.P., Keith, J., Zinman, L., Rogaeva, E., et Robertson, J. (2016). MTHFSD and DDX58 are novel RNA-binding proteins abnormally regulated in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 139, 86-100.

Mahoney, C.J., Beck, J., Rohrer, J.D., Lashley, T., Mok, K., Shakespeare, T., Yeatman, T., Warrington, E.K., Schott, J.M., Fox, N.C., et al. (2012). Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: Clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 135, 736-750.

Majounie, E., Renton, A.E., Mok, K., Dopper, E.G.P., Waite, A., Rollinson, S., Chiò, A., Restagno, G., Nicolaou, N., Simon-Sanchez, J., et al. (2012). Frequency of the C9orf72 hexanucleotide repeat expansion in patients with amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: A cross-sectional study. *Lancet Neurol.* 11, 323-330.

Majumder, P., Chen, Y.T., Bose, J.K., Wu, C.C., Cheng, W.C., Cheng, S.J., Fang, Y.H., Chen, Y.L., Tsai, K.J., Lien, C.C., et al. (2012). TDP-43 regulates the mammalian spinogenesis through

Bibliographie

- translational repression of Rac1. *Acta Neuropathol.* 124, 231-245. Mandelkow, E.M., Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., et Mandelkow, E. (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol. Aging* 24, 1079-1085.
- Mann, D.M., South, P., Snowden, J.S., et Neary, D. (1993). Dementia of frontal lobe type. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51, 353-361.
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-cochran, O.N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R.M., Lamb, B.T., et Bhaskar, K. (2015). Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* 138, 1738-1755.
- Martens, L.H., Zhang, J., Barmada, S.J., Zhou, P., Kamiya, S., Sun, B., Min, S.W., Gan, L., Finkbeiner, S., Huang, E.J., et al. (2012). Progranulin deficiency promotes neuroinflammation and neuron loss following toxin-induced injury. *J. Clin. Invest.* 122, 3955-3959.
- Matsuo, E.S., Shin, R.W., Billingsley, M.L., Van deVoorde, A., O'Connor, M., Trojanowski, J.Q., et Lee, V.M.Y. (1994). Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 13, 989-1002.
- McDonald, K.K., Aulas, A., Destroismaisons, L., Pickles, S., Beleac, E., Camu, W., Rouleau, G. a, et Vande Velde, C. (2011). TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) regulates stress granule dynamics via differential regulation of G3BP and TIA-1. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1400-1410.
- Mesulam, M.M. (1982). Slowly progressive aphasia without generalized dementia. *Ann. Neurol.* 11, 592-598.
- Mesulam, M.-M. (2003). Primary Progressive Aphasia --- A Language-Based Dementia. *N. Engl. J. Med.* 349, 1535-1542.
- Mizielinska, S., Lashley, T., Norona, F.E., Clayton, E.L., Ridler, C.E., Fratta, P., et Isaacs, A.M. (2013). C9orf72 frontotemporal lobar degeneration is characterised by frequent neuronal sense and antisense RNA foci. 845-857.
- Mori, K., Weng, S.M., Arzberger, T., May, S., Rentzsch, K., Kremmer, E., Schmid, B., Kretzschmar, H.A., Cruts, M., Van, C., et al. (2013). The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide- Repeat proteins in FTL/ALS. *Virology* 1-6.
- Morimoto, M., et Boerkoel, C. (2013). The Role of Nuclear Bodies in Gene Expression and Disease. *Biology (Basel)*. 2, 976-1033.
- Morris, M., Knudsen, G.M., Maeda, S., Trinidad, J.C., Ioanoviciu, A., Burlingame, A.L., et Mucke, L. (2015). Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 18, 1183-1189.
- Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., et Zweckstetter, M. (2009). Structural polymorphism of 441-residue Tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 7, 0399-0414.
- Mummery, C.J., Patterson, K., Price, C., Ashburner, J., Frackowiak, R., et Hodges, J.R. (2000). A voxel-based morphometry study of semantic dementia: Relationship between temporal lobe atrophy and semantic memory. *Ann. Med.* 47, 36-45.
- Munoz, D.G., Neumann, M., Kusaka, H., Kuroda, S., et Mackenzie, I.R. (2009). FUS pathology in basophilic inclusion body disease. 617-627.

N

- Naphade, S.B., Kigerl, K.A., Jakeman, L.B., Kostyk, S.K., Popovich, P.G., et Kuret, J. (2010). Progranulin expression is upregulated after spinal contusion in mice. *Acta Neuropathol.* *119*, 123-133.
- Narayanan, R.K., Mangelsdorf, M., Panwar, A., Butler, T.J., Noakes, P.G., et Wallace, R.H. (2012). Identification of RNA bound to the TDP-43 ribonucleoprotein complex in the adult mouse brain. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* *8421*, 1-9.
- Neary, D., Snowden, J.S., Gustafson, L., Passant, U., Stuss, D., Black, S., Freedman, M., Kertesz, a, Robert, P.H., Albert, M., et al. (1998). Frontotemporal lobar degeneration A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* *51*, 1546-1554.
- Nedergaard, M., Ransom, B., et Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* *26*, 523-530.
- Nelson, P.T., et Keller, J.N. (2007). RNA in brain disease: no longer just « the messenger in the middle ». *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *66*, 461-468.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* *314*, 130-133.
- Neumann, M., Mackenzie, I.R., Cairns, N.J., Boyer, P.J., Markesbery, W.R., Smith, C.D., Taylor, J.P., Kretschmar, H.A., Kimonis, V.E., et Forman, M.S. (2007). TDP-43 in the Ubiquitin Pathology of Frontotemporal Dementia With VCP Gene Mutations. *66*, 152-157.
- Neumann, M., Kwong, L.K., Lee, E.B., Kremmer, E., Flatley, A., Xu, Y., Forman, M.S., Troost, D., Kretschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., et al. (2009a). Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol.* *117*, 137-149.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretschmar, H.A., et MacKenzie, I.R.A. (2009b). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* *132*, 2922-2931.
- Neumann, M., Bentmann, E., Dormann, D., Jawaid, A., Dejesus-hernandez, M., Ansorge, O., Roeber, S., Kretschmar, H.A., Munoz, D.G., Kusaka, H., et al. (2011). FET proteins TAF15 and EWS are selective markers that distinguish FTLD with FUS pathology from amyotrophic lateral sclerosis with FUS mutations.
- Nishimoto, Y., Nakagawa, S., Hirose, T., Okano, H.J., Takao, M., Shibata, S., Suyama, S., Kuwako, K., Imai, T., Murayama, S., et al. (2013). The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Brain* *6*, 1.
- Noble, W., Hanger, D.P., Miller, C.C.J., et Lovestone, S. (2013). The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front. Neurol.* *4 JUL*, 1-11.
- Nonaka, T., Kametani, F., Arai, T., Akiyama, H., et Hasegawa, M. (2009). Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 3353-3364.

Bibliographie

Nonaka, T., Masuda-Suzukake, M., Arai, T., Hasegawa, Y., Akatsu, H., Obi, T., Yoshida, M., Murayama, S., Mann, D.M.A., Akiyama, H., et al. (2013). Prion-like Properties of Pathological TDP-43 Aggregates from Diseased Brains. *Cell Rep.* 4, 124-134.

O

O'Brien, J.T., Burns, A., et Group, B.A.P.D.C. (2011). Clinical practice with anti-dementia drugs: a revised (second) consensus statement from the British Association for Psychopharmacology. *J Psychopharmacol* 25, 997-1019.

Okamoto, K., Hirai, S., Yamazaki, T., Sun, X., et Nakazato, Y. (1991). New ubiquitin-positive intraneuronal inclusions in the extra-motor cortices in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 129, 233-236.

Onari, K., et Spatz, H. (1926). Anatomische beitraige zur lehre von der pickschen umschriebenen grosshirnrindenatrophie ('picksche krankheit'). *Ztschr Ges Neurol Psychiatr* 101, 470–511.

Onyike, C.U., et Diehl-Schmid, J. (2013). The epidemiology of frontotemporal dementia. *Int. Rev. Psychiatry* 25, 130-137.

Ou, S.H., Wu, F., Harrich, D., García-Martínez, L.F., et Gaynor, R.B. (1995). Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J. Virol.* 69, 3584-3596.

P

Padovani, A., Agosti, C., Premi, E., Bellelli, G., et Borroni, B. (2007). Extrapyrimal symptoms in Frontotemporal Dementia: Prevalence and clinical correlations. *Neurosci. Lett.* 422, 39-42.

Paloneva, J., Kestilä, M., Wu, J., Salminen, a, Böhling, T., Ruotsalainen, V., Hakola, P., Bakker, a B., Phillips, J.H., Pekkarinen, P., et al. (2000). Loss-of-function mutations in TYROBP (DAP12) result in a presenile dementia with bone cysts. *Nat. Genet.* 25, 357-361.

Pesiridis, G.S., Tripathy, K., Tanik, S., Trojanowski, J.Q., et Lee, V.M.-Y. (2011). A « two-hit » hypothesis for inclusion formation by carboxyl-terminal fragments of TDP-43 protein linked to RNA depletion and impaired microtubule-dependent transport. *J. Biol. Chem.* 286, 18845-18855.

Petkau, T.L., et Leavitt, B.R. (2014a). Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* 37, 388-398.

Petkau, T.L., et Leavitt, B.R. (2014b). Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci.* 37, 388-398.

Petkau, T.L., Neal, S.J., Orban, P.C., MacDonald, J.L., Hill, a M., Lu, G., Feldman, H.H., Mackenzie, I.R. a, et Leavitt, B.R. (2010). Progranulin expression in the developing and adult murine brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 3931-3947.

Petkau, T.L., Neal, S.J., Milnerwood, A., Mew, A., Hill, A.M., Orban, P., Gregg, J., Lu, G., Feldman, H.H., Mackenzie, I.R.A., et al. (2012). Synaptic dysfunction in progranulin-deficient mice. *Neurobiol. Dis.* 45, 711-722.

Petoukhov, E., Fernando, S., Mills, F., Shivji, F., Hunter, D., Krieger, C., Silverman, M. a, et Bamji, S.X. (2013). Activity-dependent secretion of progranulin from synapses. *J. Cell Sci.* 126, 5412-5421.

Bibliographie

- Philips, T., De Muynck, L., Thu, H.N.T., Weynants, B., Vanacker, P., Dhondt, J., Slegers, K., Schelhaas, H.J., Verbeek, M., Vandenberghe, R., et al. (2010). Microglial upregulation of progranulin as a marker of motor neuron degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *69*, 1191-1200.
- Pick, A. (1892). Ueber die Beziehungen der senilen Hirnatrophie zur Aphasie. *Prager med Wschr* *17*, 165–167.
- Piguat, O., Halliday, G.M., Reid, W.G.J., Casey, B., Carman, R., Huang, Y., Xuereb, J.H., Hodges, J.R., et Kril, J.J. (2011). Clinical phenotypes in autopsy-confirmed pick disease. *Neurology* *76*, 253-259.
- Piscopo, P., Albani, D., Castellano, A.E., Forloni, G., et Confaloni, A. (2016). Frontotemporal Lobar Degeneration and MicroRNAs. *Front. Aging Neurosci.* *8*, 1-7.
- Pollock, N., Mirra, S., Binder, L., Hansen, L., et Wood, J. (1986). Filamentous Aggregates in Pick's Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and Alzheimer's Disease Share Antigenic Determinants With Microtubule-Associated Protein, Tau. *Lancet* *328*, 1211.
- Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R., Huelga, S.C., Moran, J., Liang, T.Y., Ling, S.-C., Sun, E., Wancewicz, E., Mazur, C., et al. (2011). Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat. Neurosci.* *14*, 459-468.
- Pottier, C., Bieniek, K.F., Finch, N.C., van de Vorst, M., Baker, M., Perkersen, R., Brown, P., Ravenscroft, T., van Blitterswijk, M., Nicholson, A.M., et al. (2015a). Whole-genome sequencing reveals important role for TBK1 and OPTN mutations in frontotemporal lobar degeneration without motor neuron disease. *Acta Neuropathol.* *130*, 77-92.
- Pottier, C., Baker, M., Dickson, D.W., et Rademakers, R. (2015b). PRKAR1B mutations are a rare cause of FUS negative neuronal intermediate filament inclusion disease. *Brain* *138*, e357-e357.
- Protter, D.S.W., et Parker, R. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol.* *26*, 668-679.

R

- Rabinovici, G., et Miller, B. (2010). Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* *24*, 375-398.
- Rademakers, R., Baker, M., Nicholson, A.M., Rutherford, N.J., Finch, N., Soto-Ortolaza, A., Lash, J., Wider, C., Wojtas, A., DeJesus-Hernandez, M., et al. (2011). Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat. Genet.* *44*, 200-205.
- Rademakers, R., Neumann, M., et Mackenzie, I.R. (2012a). Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurol.* *8*, 423-434.
- Rademakers, R., Neumann, M., et Mackenzie, I.R. (2012b). Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat. Rev. Neurol.* 1-12.
- Rascovsky, K., Hodges, J.R., Knopman, D., Mendez, M.F., Kramer, J.H., Neuhaus, J., Van Swieten, J.C., Seelaar, H., Dopper, E.G.P., Onyike, C.U., et al. (2011). Sensitivity of revised diagnostic criteria for the behavioural variant of frontotemporal dementia. *Brain* *134*, 2456-2477.
- Ratti, A., et Buratti, E. (2016). Physiological Functions and Pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J. Neurochem.* *138*, n/a-n/a.

Bibliographie

- Ravenscroft, T.A., Baker, M.C., Rutherford, N.J., Neumann, M., Mackenzie, I.R., Josephs, K.A., Boeve, B.F., Petersen, R., Halliday, G.M., Kril, J., et al. (2013). Mutations in protein N-arginine methyltransferases are not the cause of FTLN-FUS. *Neurobiol. Aging* 34, 2235.e11-2235.e13.
- Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257-268.
- Ringholz, G.M., Appel, S.H., Bradshaw, M., Cooke, N.A., Mosnik, D.M., et Schulz, P.E. (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology* 65, 586-590.
- Roberson, E.D., Filiano, A.J., Martens, L.H., Young, A.H., Warmus, B.A., Zhou, P., Diaz-Ramirez, G., Jiao, J., Zhang, Z., Huang, E.J., et al. (2013). Dissociation of frontotemporal dementia-related deficits and neuroinflammation in progranulin haploinsufficient mice. *Ann. Intern. Med.* 158, 5352-5362.
- Roberts, T.C., Morris, K. V, Wood, M.J. a, et B, P.T.R.S. (2014). function and neurological disease The role of long non-coding RNAs in neurodevelopment , brain function and neurological disease.
- Roeber, S., Mackenzie, I.R.A., Kretzschmar, H.A., et Neumann, M. (2008). TDP-43-negative FTLN-U is a significant new clinico-pathological subtype of FTLN. *Acta Neuropathol.* 116, 147-157.
- Rohrer, J.D., Warren, J.D., Modat, M., Ridgway, G.R., Douiri, A., Rossor, M.N., Ourselin, S., et Fox, N.C. (2009). Patterns of cortical thinning in the language variants of frontotemporal lobar degeneration. *Neurology* 1562-1569.
- Rohrer, J.D., Caso, F., Mahoney, C., Henry, M., Rosen, H.J., Rabinovici, G., Rossor, M.N., Miller, B., Warren, J.D., Fox, N.C., et al. (2013). Patterns of longitudinal brain atrophy in the logopenic variant of primary progressive aphasia. *Brain Lang.* 127, 121-126.
- Rostgaard, N., Waldemar, G., Nielsen, J.E., et Simonsen, A.H. (2015). Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Familial Forms of Alzheimer's Disease and Frontotemporal Dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 40, 54-62.

S

- Saito, Y., Ruberu, N.N., Sawabe, M., Arai, T., Tanaka, N., Kakuta, Y., Yamanouchi, H., et Murayama, S. (2004). Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 911-918.
- Salazar, D. a., Butler, V.J., Argouarch, a. R., Hsu, T.-Y., Mason, A., Nakamura, A., McCurdy, H., Cox, D., Ng, R., Pan, G., et al. (2015). The progranulin cleavage products, granulins, exacerbate TDP-43 toxicity and increase TDP-43 levels. *J. Neurosci.* 35, 9315-9328.
- Saman, S., Lee, N.C.Y., Inoyo, I., Jin, J., Li, Z., et Doyle, T. (2014). Proteins Recruited to Exosomes by Tau Overexpression Implicate Novel Cellular Mechanisms Linking Tau Secretion with Alzheimer ' s Disease. *J. Alzheimer's Dis.* 40, S47-70.
- Sanders, D.W., Kaufman, S.K., DeVos, S.L., Sharma, A.M., Mirbaha, H., Li, A., Barker, S.J., Foley, A.C., Thorpe, J.R., Serpell, L.C., et al. (2014). Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82, 1271-1288.

Bibliographie

- Santa-Maria, I., Alaniz, M.E., Renwick, N., Cela, C., Fulga, T.A., Van Vactor, D., Tuschl, T., Clark, L.N., Shelanski, M.L., McCabe, B.D., et al. (2015). Dysregulation of microRNA-219 promotes neurodegeneration through post-transcriptional regulation of tau. *J. Clin. Invest.* *125*, 681-686.
- Schneider, a, Biernat, J., Bergen, M. Von, Mandelkow, E., et Mandelkow, E.M. (1999). Phosphorylation that detaches tau from microtubules S262 and S214 protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *J. Neurochem.* *73*, S26-S26.
- Schroeter, M.L., Raczka, K., Neumann, J., et von Cramon, D.Y. (2008). Neural networks in frontotemporal dementia-A meta-analysis. *Neurobiol. Aging* *29*, 418-426.
- Schwartz, J.C., Cech, T.R., et Parker, R.R. (2014). Biochemical Properties and Biological Functions of FET Proteins. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 141210135300003.
- Seelaar, H., Kamphorst, W., Rosso, S.M., Azmani, A., Masdjedi, R., De Koning, I., Maat-Kievit, J.A., Anar, B., Kaat, L.D., Breedveld, G.J., et al. (2008). Distinct genetic forms of frontotemporal dementia. *Neurology* *71*, 1220-1226.
- Seelaar, H., Rohrer, J.D., Pijnenburg, Y. a L., Fox, N.C., et van Swieten, J.C. (2011). Clinical, genetic and pathological heterogeneity of frontotemporal dementia: a review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *82*, 476-486.
- Seifert, G., Schilling, K., et Steinhäuser, C. (2006). Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 194-206.
- Sephton, C.F., Cenik, C., Kucukural, A., Dammer, E.B., Cenik, B., Han, Y., Dewey, C.M., Roth, F.P., Herz, J., Peng, J., et al. (2011). Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *J. Biol. Chem.* *286*, 1204-1215.
- Sergeant, N., et Buee, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* *1739*, 179-197.
- Sergeant, N., Wattez, A., et Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary Degeneration in Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration. Tau Pathologies with Exclusively « Exon10 » Isoforms. *J. Neurochem.* *72*, 1243-1249.
- Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C. a, Wattez, A., Vermersch, P., et Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 2143-2155.
- Seyfried, N.T., Gozal, Y.M., Dammer, E.B., Xia, Q., Duong, D.M., Cheng, D., Lah, J.J., Levey, A.I., et Peng, J. (2010). Multiplex SILAC Analysis of a Cellular TDP-43 Proteinopathy Model Reveals Protein Inclusions Associated with SUMOylation and Diverse Polyubiquitin Chains * □. *Mol. Cell. Proteomics* *9*, 705-718.
- Sha, S., Hou, C., Viskontas, I. V, et Miller, B.L. (2006). Are frontotemporal lobar degeneration, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration distinct diseases? *Nat. Clin. Pract. Neurol.* *2*, 658-665.
- Shankaran, S.S., Capell, A., Hruscha, A.T., Fellerer, K., Neumann, M., Schmid, B., et Haass, C. (2008). Missense mutations in the progranulin gene linked to frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-immunoreactive inclusions reduce progranulin production and secretion. *J. Biol. Chem.* *283*, 1744-1753.
- Sieben, A., Van Langenhove, T., Engelborghs, S., Martin, J.J., Boon, P., Cras, P., De Deyn, P.P., Santens, P., Van Broeckhoven, C., et Cruts, M. (2012). The genetics and neuropathology of frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* *124*, 353-372.

Bibliographie

- Sjöberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., et Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J. Cell Sci.* *119*, 2025-2034.
- Skibinski, G., Parkinson, N.J., Brown, J.M., Chakrabarti, L., Lloyd, S.L., Hummerich, H., Nielsen, J.E., Hodges, J.R., Spillantini, M.G., Thusgaard, T., et al. (2005). Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat. Genet.* *37*, 806-808.
- Smith, K.R., Damiano, J., Franceschetti, S., Carpenter, S., Canafoglia, L., Morbin, M., Rossi, G., Pareyson, D., Mole, S.E., Staropoli, J.F., et al. (2012). Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 1102-1107.
- Smith, P.Y., Hernandez-Rapp, J., Jolivet, F., Lecours, C., Bisht, K., Goupil, C., Dorval, V., Parsi, S., Morin, F., Planel, E., et al. (2015). miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 6721-6735.
- Snowden, J.S., Adams, J., Harris, J., Thompson, J.C., Rollinson, S., Richardson, A., Jones, M., Neary, D., Mann, D.M., et Pickering-Brown, S. (2015). Distinct clinical and pathological phenotypes in frontotemporal dementia associated with MAPT, PGRN and C9orf72 mutations. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* *8421*, 1-9.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* *32*, 638-647.
- Sofroniew, M. V., et Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol.* *119*, 7-35.
- Spillantini, M.G., et Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* *12*, 609-622.
- Sreedharan, J., Blair, I.P., Tripathi, V.B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J.C., Williams, K.L., Buratti, E., et al. (2008). Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* (80-.). *319*, 1668-1672.
- Strong, M.J., Volkening, K., Hammond, R., Yang, W., Strong, W., Leystra-Lantz, C., et Shoesmith, C. (2007). TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol. Cell. Neurosci.* *35*, 320-327.
- Suh, H.S., Choi, N., Tarassishin, L., et Lee, S.C. (2012). Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (mmp-12). *PLoS One* *7*, 1-11.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* *286*, 4566-4575.
- Suzuki, H., Lee, K., et Matsuoka, M. (2011). TDP-43-induced death is associated with altered regulation of BIM and Bcl-xL and attenuated by caspase-mediated TDP-43 cleavage. *J. Biol. Chem.* *286*, 13171-13183.
- Swinnen, B., et Robberecht, W. (2014). The phenotypic variability of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Publ. Gr.* *10*, 661-670.

T

-
- Tan, A.Y., et Manley, J.L. (2009). The TET family of proteins: Functions and roles in disease. *J. Mol. Cell Biol.* *1*, 82-92.
- Tapia, L., Milnerwood, A., Guo, A., Mills, F., Yoshida, E., Vasuta, C., Mackenzie, I.R., Raymond, L., Cynader, M., Jia, W., et al. (2011). Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. *J. Neurosci.* *31*, 11126-11132.
- Tian, H., Davidowitz, E., Lopez, P., Emadi, S., Moe, J., et Sierks, M. (2013). Trimeric tau is toxic to human neuronal cells at low nanomolar concentrations. *Int. J. Cell Biol.* *2013*.
- Ticozzi, N., Vance, C., LeClerc, A.L., Keagle, P., Glass, J.D., McKenna-Yasek, D., Sapp, P.C., Silani, V., Bosco, D.A., Shaw, C.E., et al. (2011). Mutational analysis reveals the FUS homolog TAF15 as a candidate gene for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* *156*, 285-290.
- Tollervey, J.R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., König, J., Hortobágyi, T., Nishimura, A.L., Zupunski, V., et al. (2011). Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat. Neurosci.* *14*, 452-458.
- Trabzuni, D., Wray, S., Vandrovцова, J., Ramasamy, A., Walker, R., Smith, C., Luk, C., Gibbs, J.R., Dillman, A., Hernandez, D.G., et al. (2012). MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region: relation to genotype and implication for tauopathies. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 4094-4103.
- Tsai, R.M., et Boxer, A.L. (2016). Therapy and clinical trials in frontotemporal dementia: past, present, and future. *J. Neurochem.* *138*, 211-221.

U

-
- Urwin, H., Josephs, K.A., Rohrer, J.D., MacKenzie, I.R., Neumann, M., Authier, A., Seelaar, H., Van Swieten, J.C., Brown, J.M., Johannsen, P., et al. (2010). FUS pathology defines the majority of tau-and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* *120*, 33-41.
- Utton, M. a, Noble, W.J., Hill, J.E., Anderton, B.H., et Hanger, D.P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *J. Cell Sci.* *118*, 4645-4654.

V

-
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K.J., Nishimura, A.L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* (80-.). *23*, 1208-11.
- Vershinin, M., Carter, B.C., Razafsky, D.S., King, S.J., et Gross, S.P. (2007). Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 87-92.
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nessler, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., et al. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 84.

Voigt, A., Herholz, D., Fiesel, F.C., Kaur, K., Müller, D., Karsten, P., Weber, S.S., Kahle, P.J., Marquardt, T., et Schulz, J.B. (2010). TDP-43-mediated neuron loss In Vivo requires RNA-binding activity. *PLoS One* 5.

W

Wang, Y., et Mandelkow, E. (2012). Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 644-652.

Wang, Y., et Mandelkow, E. (2015). Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 22-35.

Wang, I.-F., Wu, L.-S., Chang, H.-Y., et Shen, C.-K.J. (2008). TDP-43, the signature protein of FTLD-U, is a neuronal activity-responsive factor. *J. Neurochem.* 105, 797-806.

Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., et Iqbal, K. (1996). Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated τ by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1. *Mol. Brain Res.* 38, 200-208.

Wang, Y.F., Sun, M.Y., Hou, Q., et Parpura, V. (2013). Hyposmolality differentially and spatiotemporally modulates levels of glutamine synthetase and serine racemase in rat supraoptic nucleus. *Glia* 61, 529-538.

Warrington, E.K. (2007). Quarterly Journal of Experimental Psychology The selective impairment of semantic memory THE SELECTIVE IMPAIRMENT OF. *Q. J. Exp. Psychol.* 27, 635-657.

Wegmann, S., Maury, E.A., Kirk, M.J., Saqran, L., Roe, A., Devos, S.L., Nicholls, S., Fan, Z., Takeda, S., Cagsal-getkin, O., et al. (2015). Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. 34, 3028-3041.

Wegorzewska, I., Bell, S., Cairns, N.J., Miller, T.M., et Baloh, R.H. (2009). TDP-43 mutant transgenic mice develop features of ALS and frontotemporal lobar degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18809-18814.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., et Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858-1862.

Whiteman, I.T., Gervasio, O.L., Cullen, K.M., Guillemin, G.J., Jeong, E. V, Witting, P.K., Antao, S.T., Minamide, L.S., Bamberg, J.R., et Goldsberry, C. (2009). Activated actin-depolymerizing factor/cofilin sequesters phosphorylated microtubule-associated protein during the assembly of alzheimer-like neuritic cytoskeletal striations. *J Neurosci* 29, 12994-13005.

Whitwell, J.L., Sampson, L., Watt, C., Harvey, R.J., Rossor, N., et Fox, C. (2005). A Volumetric Magnetic Resonance Imaging Study of the Amygdala in Frontotemporal Lobar Degeneration and Alzheimer ' s Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 20, 238-244.

Whitwell, J.L., Weigand, S.D., Boeve, B.F., Senjem, M.L., Gunter, J.L., DeJesus-Hernandez, M., Rutherford, N.J., Baker, M., Knopman, D.S., Wszolek, Z.K., et al. (2012). Neuroimaging signatures of frontotemporal dementia genetics: C9ORF72, tau, progranulin and sporadics. *Brain* 135, 794-806.

Williams, D.R., Holton, J.L., Strand, C., Pittman, A., De Silva, R., Lees, A.J., et Revesz, T. (2007). Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain* 130, 1566-1576.

Wils, H., Kleinberger, G., Pereson, S., Janssens, J., Capell, A., Van Dam, D., Cuijt, I., Joris, G., De

Bibliographie

- Deyn, P.P., Haass, C., et al. (2012). Cellular ageing, increased mortality and FTLTD-TDP-associated neuropathology in progranulin knockout mice. *J. Pathol.* 228, 67-76.
- Winton, M.J., Igaz, L.M., Wong, M.M., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q., et Lee, V.M.-Y. (2008). Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J. Biol. Chem.* 283, 13302-13309.
- Wong, T.H., Chiu, W.Z., Breedveld, G.J., Li, K.W., Verkerk, A.J.M.H., Hondius, D., Hukema, R.K., Seelaar, H., Frick, P., Severijnen, L.A., et al. (2014). PRKAR1B mutation associated with a new neurodegenerative disorder with unique pathology. *Brain* 137, 1361-1373.
- Woollacott, I.O., et Rohrer, J.D. (2016). The clinical spectrum of sporadic and familial forms of frontotemporal dementia. *J. Neurochem.* 1-26.
- Woollacott, I.O.C., et Mead, S. (2014). The C9ORF72 expansion mutation: Gene structure, phenotypic and diagnostic issues. *Acta Neuropathol.* 127, 319-332.
- Woolley, J.D., Khan, B.K., Murthy, N.K., Miller, B.L., et Rankin, K.P. (2011). The diagnostic challenge of psychiatric symptoms in neurodegenerative disease: Rates of and risk factors for prior psychiatric diagnosis in patients with early neurodegenerative disease. *J. Clin. Psychiatry* 72, 126-133.

X

- Xu, Y.-F., Gendron, T.F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M.C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., et al. (2010). Wild-Type Human TDP-43 Expression Causes TDP-43 Phosphorylation, Mitochondrial Aggregation, Motor Deficits, and Early Mortality in Transgenic Mice. *J. Neurosci.* 30, 10851-10859.

Y

- Yamashita, M., Nonaka, T., Hirai, S., Miwa, A., Okado, H., Arai, T., Hosokawa, M., Akiyama, H., et Hasegawa, M. (2014). Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions. *Hum. Mol. Genet.* 23, 4345-4356.
- Yang, C., Tan, W., Whittle, C., Qiu, L., Cao, L., Akbarian, S., et Xu, Z. (2010). The C-terminal TDP-43 fragments have a high aggregation propensity and harm neurons by a dominant-negative mechanism. *PLoS One* 5.
- Yin, F., Dumont, M., Banerjee, R., Ma, Y., Li, H., Lin, M.T., Beal, M.F., Nathan, C., Thomas, B., et Ding, A. (2010). Behavioral deficits and progressive neuropathology in progranulin-deficient mice: a mouse model of frontotemporal dementia. *FASEB J.* 24, 4639-4647.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., et Nixon, R.A. (2008). Axonal Transport Rates In Vivo Are Unaffected by Tau Deletion or Overexpression in Mice. *J. Neurosci.* 28, 1682-1687.
- Yuzwa, S.A., Cheung, A.H., Okon, M., McIntosh, L.P., et Vocablo, D.J. (2014). O-GlcNAc Modification of tau Directly Inhibits Its Aggregation without Perturbing the Conformational Properties of tau Monomers. *J. Mol. Biol.* 426, 1736-1752.

Z

-
- Zhang, Y.-J., Xu, Y., Dickey, C. a, Buratti, E., Baralle, F., Bailey, R., Pickering-Brown, S., Dickson, D., et Petrucelli, L. (2007). Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J. Neurosci.* *27*, 10530-10534.
- Zhang, Y.-J., Gendron, T.F., Xu, Y.-F., Ko, L.-W., Yen, S.-H., et Petrucelli, L. (2010). Phosphorylation regulates proteasomal-mediated degradation and solubility of TAR DNA binding protein-43 C-terminal fragments. *Mol. Neurodegener.* *5*, 1-13.
- Zhang, Y.-J., Gendron, T.F., Grima, J.C., Sasaguri, H., Jansen-West, K., Xu, Y.-F., Katzman, R.B., Gass, J., Murray, M.E., Shinohara, M., et al. (2016). C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins. *Nat. Neurosci.* *19*, 668-677.
- Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Kang, S.S., Kwon, I.-S., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Hu, W.T., Liu, Z., Wang, J.-Z., et al. (2014). Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* *20*, 1254-1262.
- Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Van Deerlin, V.M., Bruce, J., Shuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., Arnold, S.E., Masliah, E., Galasko, D., et al. (2001). Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. *Ann. Neurol.* *49*, 165-175.
- Zhukareva, V., Mann, D., Pickering-Brown, S., Uryu, K., Shuck, T., Shah, K., Grossman, M., Miller, B.L., Hulette, C.M., Feinstein, S.C., et al. (2002). Sporadic Pick's disease: A tauopathy characterized by a spectrum of pathological ?? isoforms in gray and white matter. *Ann. Neurol.* *51*, 730-739.
- Zhukareva, V., Sundarraj, S., Mann, D., Sjogren, M., Blenow, K., Clark, C.M., McKeel, D.W., Goate, A., Lippa, C.F., Vonsattel, J.-P., et al. (2003). Selective reduction of soluble tau proteins in sporadic and familial frontotemporal dementias: an international follow-up study. *Acta Neuropathol.* *105*, 469-476.

ANNEXES

Exemples de tests neuropsychologiques

I. MMSE

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (M.M.S.E)	Etiquette du patient
Date :	
Évalué(e) par :	
Niveau socio-culturel	

ORIENTATION

Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire. Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.

Quelle est la date complète d'aujourd'hui ?

⇒ Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :

- | | | | |
|----------------------------------|-------|------------------------------|-------|
| 1. en quelle année sommes-nous ? | !Ouu! | 4. Quel jour du mois ? | !Ouu! |
| 2. en quelle saison ? | _____ | 5. Quel jour de la semaine ? | _____ |
| 3. en quel mois ? | _____ | | |

⇒ Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous nous trouvons.

- | | |
|--|-------|
| 6. Quel est le nom de l'Hôpital où nous sommes ? | _____ |
| 7. Dans quelle ville se trouve-t-il ? | _____ |
| 8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ? | _____ |
| 9. Dans quelle province ou région est situé ce département ? | _____ |
| 10. A quel étage sommes-nous ici ? | _____ |

APPRENTISSAGE

⇒ Je vais vous dire 3 mots ; je voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les demanderai tout à l'heure.

- | | | | | | |
|------------|----|---------|----|-----------|-------|
| 11. Cigare | | [citron | | [fauteuil | _____ |
| 12. fleur | ou | [clé | ou | [tulipe | _____ |
| 13. porte | | [ballon | | [canard | _____ |

Répéter les 3 mots.

ATTENTION ET CALCUL

- ⇒ Voulez-vous compter à partir de 100 en retirant 7 à chaque fois ?
- | | |
|--------|-------|
| 14. 93 | _____ |
| 15. 86 | _____ |
| 16. 79 | _____ |
| 17. 72 | _____ |
| 18. 65 | _____ |

⇒ Pour tous les sujets, même pour ceux qui ont obtenu le maximum de points, demander : « voulez-vous épeler le mot MONDE à l'envers » : E D N O M.

RAPPEL

⇒ Pouvez-vous me dire quels étaient les 3 mots que je vous ai demandé de répéter et de retenir tout à l'heure ?

- | | | | | | |
|------------|----|---------|----|-----------|-------|
| 19. Cigare | | [citron | | [fauteuil | _____ |
| 20. fleur | ou | [clé | ou | [tulipe | _____ |
| 21. porte | | [ballon | | [canard | _____ |

LANGAGE

- | | | |
|--|--------------------|-------|
| 22. quel est le nom de cet objet? | Montrer un crayon. | _____ |
| 23. Quel est le nom de cet objet | Montrer une montre | _____ |
| 24. Écoutez bien et répétez après moi : « PAS DE MAIS, DE SI, NI DE ET » | | _____ |

⇒ Poser une feuille de papier sur le bureau, la montrer au sujet en lui disant : « écoutez bien et faites ce que je vais vous dire » (consignes à formuler en une seule fois) :

- | | |
|---|-------|
| 25. prenez cette feuille de papier avec la main droite. | _____ |
| 26. Pliez-la en deux. | _____ |
| 27. et jetez-la par terre ». | _____ |

⇒ Tendre au sujet une feuille de papier sur laquelle est écrit en gros caractères : « FERMEZ LES YEUX » et dire au sujet :

- | | |
|---------------------------------|-------|
| 28. «faites ce qui est écrit ». | _____ |
|---------------------------------|-------|

⇒ Tendre au sujet une feuille de papier et un stylo en disant :

- | | |
|---|-------|
| 29. voulez-vous m'écrire une phrase, ce que vous voulez, mais une phrase entière. » | _____ |
|---|-------|

PRAXIES CONSTRUCTIVES.

- ⇒ Tendre au sujet une feuille de papier et lui demander :
- | | |
|---|-------|
| 30. « Voulez-vous recopier ce dessin ». | _____ |
|---|-------|



SCORE TOTAL (0 à 30) _____



Batterie rapide d'efficacité frontale

Dubois et al. (2000) *Neurology* 55

Nom: _____

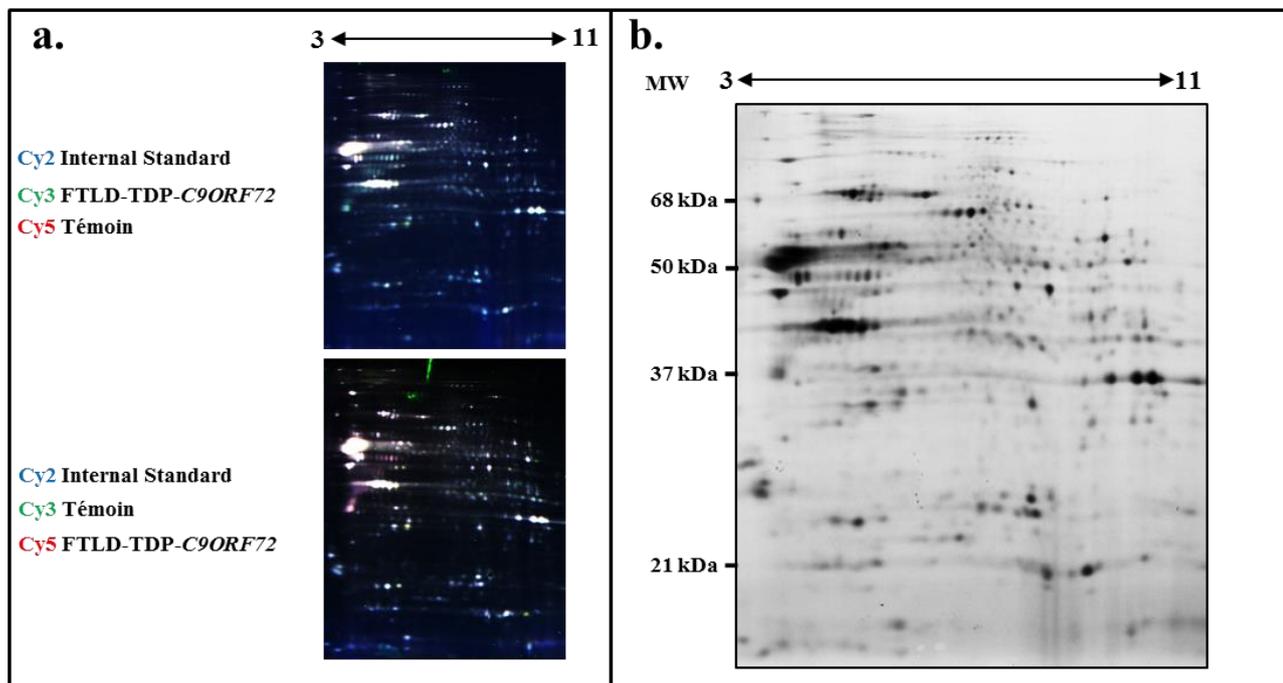
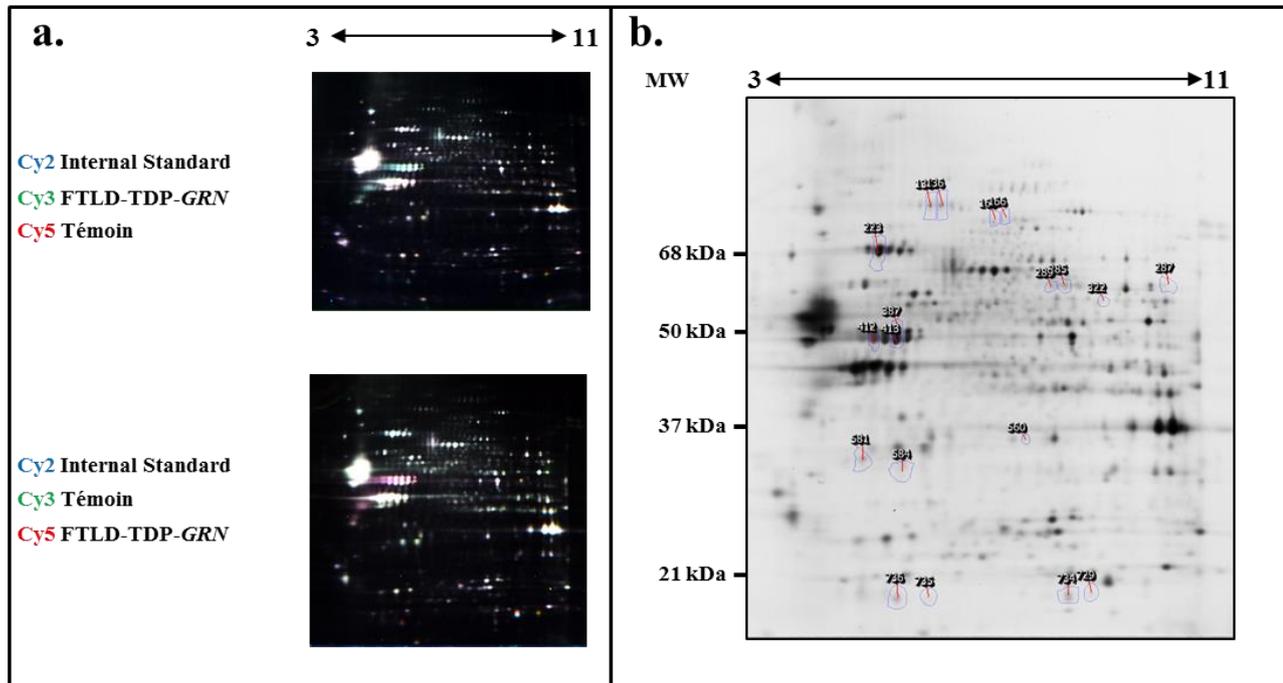
Date: _____

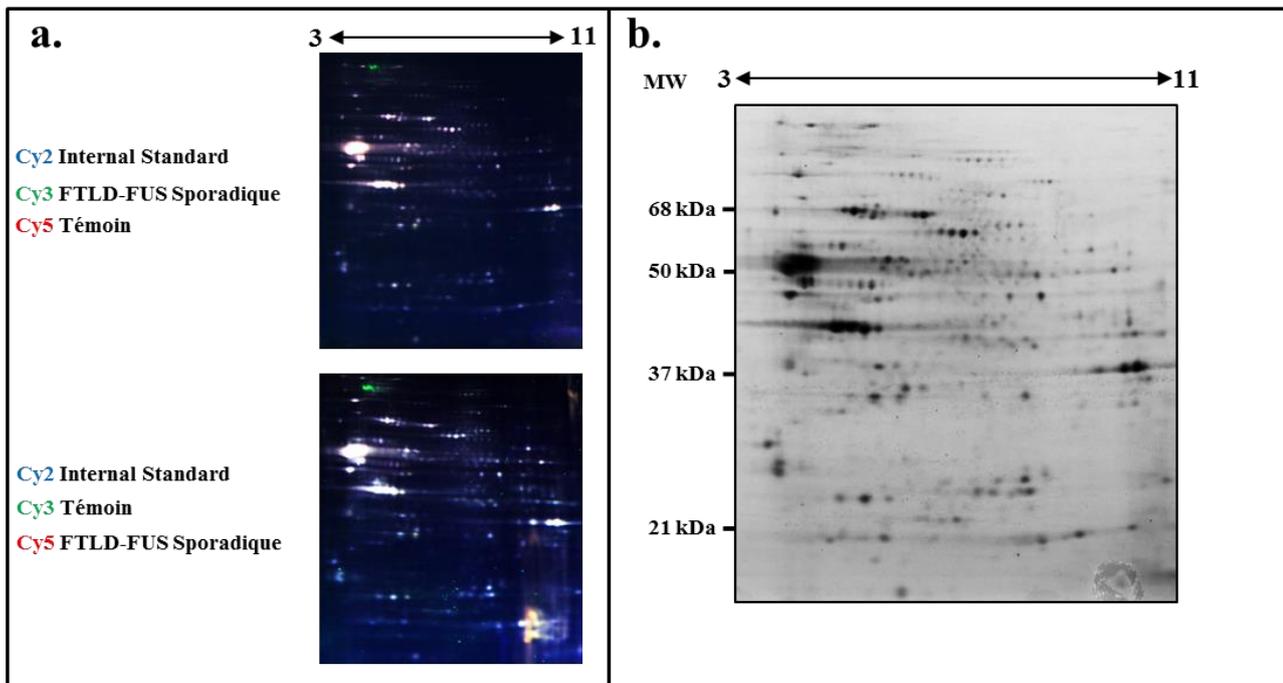
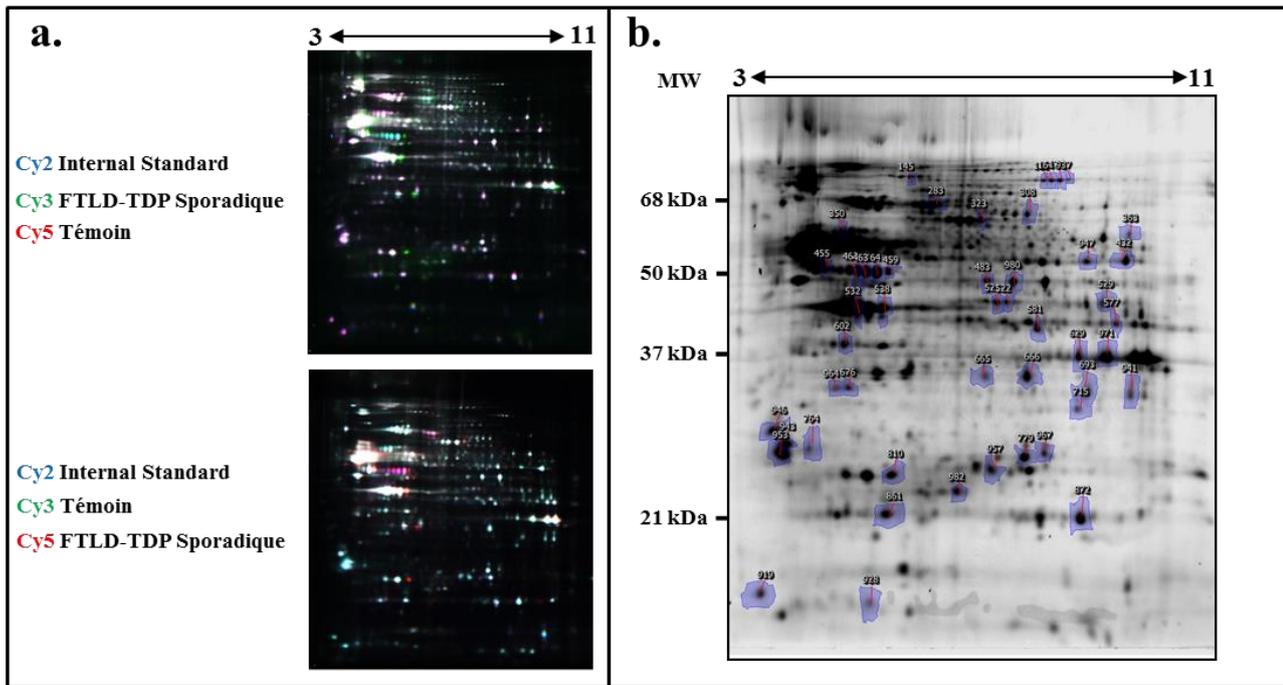
Examineur: _____

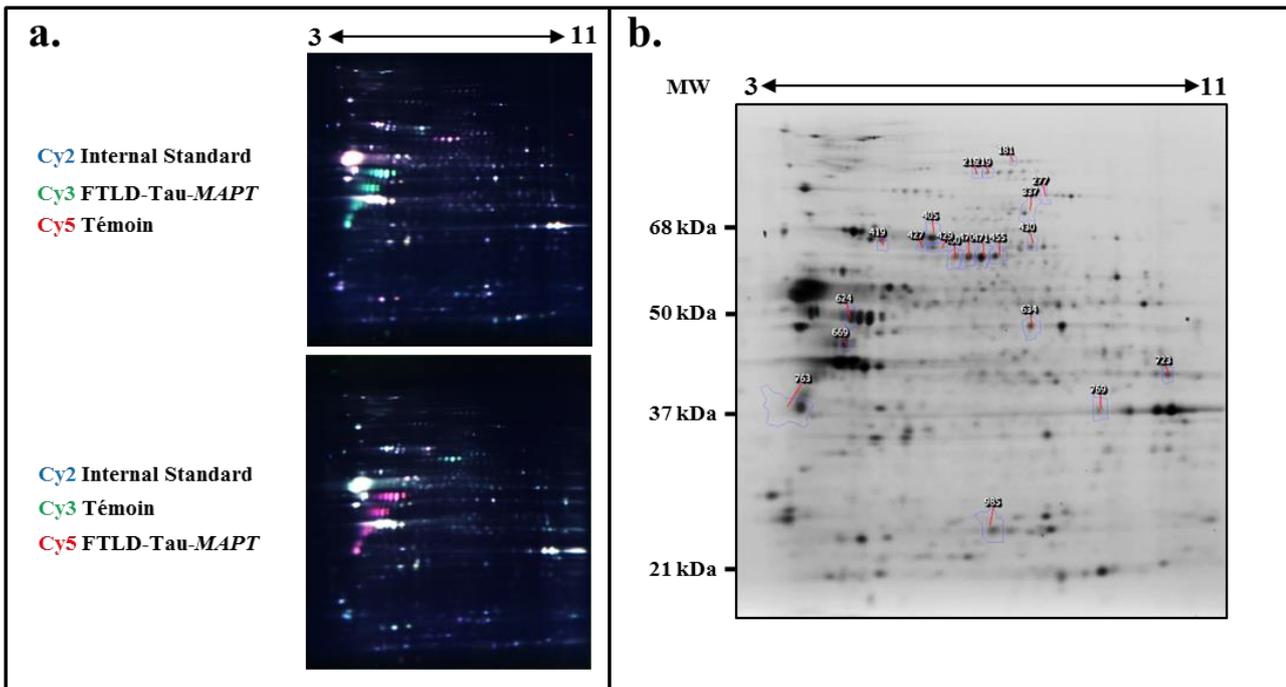
Résultat:

Domaine	Instruction	Score
1. Similitudes (conceptualisation)	"De quelle façon sont-ils semblables?" "Une banane et une orange..." (en cas d'échec, dire au patient: "Une banane et une orange sont des...", ne pas comptabiliser, ne pas aider le patient pour les deux autres items) "Une table et une chaise..." "Une tulipe, une rose et une marguerite..."	3 réussies: 3 points 2 réussies: 2 points 1 réussie: 1 point Aucune: 0 point
2. Fluidité lexicale (flexibilité mentale)	"Dites le plus grand nombre de mots commençant par la lettre 'S', n'importe quel mot sauf des noms propres ou des prénoms" Si le patient ne dit aucun mot durant les 5 premières secondes, dire "Par exemple, serpent...". S'il arrête durant 10 secondes, le stimuler en disant "n'importe quel mot commençant pas S..." Temps alloué: 60 secondes Correction: les mots répétés ou équivalents (sable et sable-mouvant) ainsi que les prénoms ou les noms propres ne sont pas comptés	10 mots et plus: 3 points 6 à 9 mots: 2 points 3 à 5 mots: 1 point 2 mots ou moins: 0 point
3. Séquences motrices (programmation)	"Regardez attentivement ce que je fais." L'examineur, assis en face du patient, exécute trois fois avec sa main gauche la série de Luria (poing – tranche – plat de la main). "Maintenant, avec votre main droite, faites la même chose, d'abord avec moi et ensuite seul." L'examineur exécute la série trois fois avec le patient et dit ensuite: "Maintenant, faites-le seul.)	6 séries réussies seul: 3 points 3 séries réussies seul: 2 points 3 séries réussies avec l'examineur: 1 point Moins de 3 séries avec l'examineur: 0 point.
4. Consignes contradictoires (sensibilité à l'interférence)	"Tapez deux coups quand j'en tape un." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 1-1-1. "Tapez un coup quand j'en tape deux." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 2-2-2. Ensuite l'examineur tape 1-1-2-1-2-2-1-1-2.	Aucune erreur: 3 points Une ou deux erreurs: 2 points Plus de deux erreurs: 1 point 4 erreurs consécutives: 0 point
5. Go – No Go (contrôle inhibiteur)	"Tapez un coup quand je tape un coup." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 1-1-1. "Ne tapez pas quand je tape deux fois." Pour s'assurer que le patient a compris, une série de trois est exécutée: 2-2-2. Ensuite l'examineur tape 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2.	Aucune erreur: 3 points Une ou deux erreurs: 2 points Plus de deux erreurs: 1 point 4 erreurs consécutives: 0 point
6. Comportement de préhension (autonomie environnementale)	"Ne prenez pas mes mains" L'examineur est assis en face du patient. Placez les mains du patient sur ses genoux, paume vers le haut. Sans dire un mot et sans regarder le patient, l'examineur place ses mains près de celles du patient et touche les paumes des deux mains pour vérifier s'il les prend spontanément. Si le patient les prend spontanément, l'examineur refait un essai après avoir dit: "Maintenant, ne prenez pas mes mains."	Ne prend pas les mains de l'examineur: 3 points Hésite et demande ce qu'il doit faire: 2 points Prend les mains sans hésitations: 1 point Prend les mains même au deuxième essai: 0 point

Cartes des *spots* dont dérégulés lors de l'analyse 2D-DIGE des différents groupes de FTLD





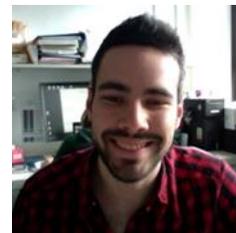


Curriculum Vitae

Anthony PAPEGAEY (26 ans)

64 Rue Jordaens
59000 Lille
Tél : 0689083095
anthony.papegae@ gmail.com

Chargé de projet de recherche doctoral



Compétences

Biologie cellulaire:

- Culture de lignées cellulaires
- Transfection
- Etablissement de lignées cellulaires inductibles stables
- Test de viabilité cellulaire (LDH et MTT)
- Immunocytochimie
- Microscopie à fluorescence

Biochimie

- Extraction de protéines
- Fractionnement subcellulaire et soluble/insoluble
- Electrophorèse monodimensionnelle et bidimensionnelle
- Electrophorèse bidimensionnelle différentielle en fluorescence (2D-DIGE)
- Digestion trypsique

Microbiologie :

- Culture de bactéries liquide et solide
- Isolation
- Transformation

Biologie Moléculaire

- Extraction d'ADN et d'ARN
- Création d'amorces nucléotidiques
Production de plasmides
- Clonage
- PCR et RT-qPCR

Informatique

- Image J, Graphpad Prism, Zen
- Word, Excel

Langues :

- Français
- Anglais (bonne compréhension orale et écrite)

Expériences Professionnelles

2013/... Thèse dans le laboratoire « Alzheimer et Tauopathies » (UMR-S 1172):

1. **Recherche:** **Caractérisation biochimique et protéomique des dégénérescences lobaires frontotemporales** - Sous la supervision du Maître de Conférence Universitaire Valérie BUEE-SCHERRER
2. **Enseignement:** Travaux pratiques de Biochimie (MED2) et travaux dirigés de biologie moléculaire (Master UE « Gènes, génome, biomolécules : concepts et méthodes d'étude »)
3. **Management:** Encadrement de stagiaire (BTS, Licence, Master 1)

2013 - Stage de Master 2 « Biologie-Santé » dans le laboratoire « Alzheimer et Tauopathies » (UMR-S 1172) (10 mois):

1. **Etude de la perte d'expression des protéines Tau dans la dégénérescence lobaire frontotemporale** - Sous la supervision du Maître de Conférence Universitaire Valérie BUEE-SCHERRER

2012 - Stage de Master 1 dans le laboratoire « Alzheimer et Tauopathies » (UMR-S 1172) (2 mois):

2. **Caractérisation biochimique des lésions cérébrales observées dans la dégénérescence lobaire frontotemporale** - Sous la supervision du Maître de Conférence Universitaire Valérie BUEE-SCHERRER

Formations/Diplômes

- 2013/...** Doctorant en Neurosciences – UMR-S 1172 – Team “Alzheimer & Tauopathies” JPArc
UMR-S1172 INSERM - CHRU Lille – UDSL (LILLE)
- 2013 -** Master 2 Recherche Biologie-Santé spécialité Physiologie et Physiopathologie des
maladies humaines – UDSL (LILLE)
- 2012 -** Master 1 Biologie-Biotechnologie spécialité Physiologie et Neurosciences intégrées
- USTL (LILLE)
- 2011 -** Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie – USTL (LILLE)

Communications orales

- 14 Septembre 2015 - 15^e édition de la Journée Andre Verbert à Lille : « **Loss of Tau protein expression defines a new subclass of FTLD-U** »
- 28 Janvier 2015 - Journée des doctorants à Lille : « **Frontotemporal dementia: Tau proteins are missing** »

Posters

- 5 Juin 2015 - Colloque de la SFR DN2M « *Troubles cognitifs : du neurone à la société* » à Lille
«**Loss of Tau protein: toward a new FTLD-U subclass?** »
Papegaey A., Fernandez-Gomez F.J., Obriot H., Eddarkaoui S., Deramecourt V., Camuzat A., Lecourtois M., Lebert F., Campion D., Pasquier F., Duyckaerts C., Le Ber I., Sergeant N., Buée L., Buée-Scherrer V.
- 18-22 Mars 2015 - 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and Related Neurological Disorders (AD/PDTM 2015) à Nice
«**Frontotemporal dementia: Tau proteins are missing**»
Papegaey A., Fernandez-Gomez F.J., Obriot H., Eddarkaoui S., Deramecourt V., Camuzat A., Lecourtois M., Lebert F., Campion D., Pasquier F., Duyckaerts C., Le Ber I., Sergeant N., Buée L., Buée-Scherrer V.
- 11-13 Juin 2014 - 12^e Réunion Francophone sur la Maladie d'Alzheimer à Montpellier
«**Démences lobaires frontotemporales, une grande absente : la protéine Tau** »
Papegaey A., Fernandez-Gomez F.J., Obriot H., Eddarkaoui S., Deramecourt V., Camuzat A., Lecourtois M., Lebert F., Campion D., Pasquier F., Duyckaerts C., Le Ber I., Sergeant N., Buée L., Buée-Scherrer V.
- 19-20 Mai 2014 - Journées thématiques de la Sociétés des Neurosciences : « *Perturbations métaboliques dans les maladies neurologiques et mentales* » à Lille
«**Where is Tau in frontotemporal lobar degeneration?** »
Papegaey A., Fernandez-Gomez F.J., Obriot H., Eddarkaoui S., Camuzat A., Deramecourt V., Lebert F., Pasquier F., Duyckaerts C., Brice A., Le Ber I., Buée L., Sergeant N., Buée-Scherrer V.

Publications

Reduced Tau protein expression is associated with frontotemporal degeneration with progranulin mutation. Papegaey A., Eddarkaoui S., Deramecourt V., Fernandez-Gomez F.J., Pantano P., Obriot H., Machala C., Anquetil V., Camuzat A., Brice A., Maurage CA., Le Ber I., Duyckaerts C., Buée L., Sergeant N., Buée-Scherrer V. *Acta Neuropathol Commun.* 2016

Tau Monoclonal Antibody Generation based on Humanized Yeast Models: Impact on Tau Oligomerization and Diagnostics. Rosseels J., Van den Brande J., Violet M., Jacobs D., Grognet P., Lopez J., Huvent I., Caldara M., Swinnen E., Papegaey A., Caillierez R., Buée-Scherrer V., Engelborghs S., Lippens G., Colin M., Buée L., Galas MC., Vanmechelen E., Winderickx J. *J Biol. Chem.* 2015

Publication principale

Reduced Tau protein expression is associated with frontotemporal degeneration with progranulin mutation.

Anthony Papegaey¹, Sabiha Eddarkaoui¹, Vincent Deramecourt¹, Francisco-Jose Fernandez-Gomez¹, Pierre Pantano¹, Hélène Obriot¹, Camille Machala¹, Vincent Anquetil², Agnès Camuzat², Alexis Brice², Claude-Alain Maurage¹, Isabelle Le Ber², Charles Duyckaerts², Luc Bu e¹, Nicolas Sergeant¹, Valérie Bu e-Scherrer^{1,3*}

¹ Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, F-59000 Lille, France

² Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, and INSERM UMRS_1127, and CNRS UMR_7225, and AP-HP, and ICM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

³ Univ. Artois, Facult  Jean Perrin, F-62307, Lens, France

* Corresponding author: Valérie Bu e-Scherrer, Inserm UMRS1172 – Alzheimer & Tauopathies, Faculty of Medicine-Research Pole, University of Lille, Place de Verdun, F-59045 Lille cedex, France. Tel: +33 (3) 20 62 20 71. Fax: +33 (3) 20 53 85 62. valerie.buee-scherrer@inserm.fr

Abstract

Reduction of Tau protein expression was described in 2003 by Zhukareva et al. in a variant of frontotemporal lobar degeneration (FTLD) referred to as diagnosis of dementia lacking distinctive histopathology, then re-classified as FTLD with ubiquitin inclusions. However, the analysis of Tau expression in FTLD has not been reconsidered since then. Knowledge of the molecular basis of protein aggregates and genes that are mutated in the FTLD spectrum would enable to determine whether the “Tau-less” is a separate pathological entity or if it belongs to an existing subclass of FTLD. To address this question, we have analyzed Tau expression in the frontal brain areas from control, Alzheimer’s disease and FTLD cases, including FTLD- Tau (MAPT), FTLD-TDP (sporadic, FTLD-TDP-GRN, FTLD-TDP-C9ORF72) and sporadic FTLD-FUS, using western blot and 2D-DIGE (Two-Dimensional fluorescence Difference Gel Electrophoresis) approaches. Surprisingly, we found that most of the FTLD-TDP-GRN brains are characterized by a

huge reduction of Tau protein expression without any decrease in Tau mRNA levels. Interestingly, only cases affected by point mutations, rather than cases with total deletion of one GRN allele, seem to be affected by this reduction of Tau protein expression. Moreover, proteomic analysis highlighted correlations between reduced Tau protein level, synaptic impairment and massive reactive astrogliosis in these FTLD-GRN cases. Consistent with a recent study, our data also bring new insights regarding the role of progranulin in neurodegeneration by suggesting its involvement in lysosome and synaptic regulation. Together, our results demonstrate a strong association between progranulin deficiency and reduction of Tau protein expression that could lead to severe neuronal and glial dysfunctions. Our study also indicates that this FTLD-TDP-GRN subgroup could be part as a distinct entity of FTLD classification.

Key words

Frontotemporal lobar degeneration, Tau protein, progranulin, synaptic impairment, astrogliosis

Introduction

Frontotemporal Lobar Degeneration (FTLD) accounts for 10 to 20% of all demented cases. With an onset usually occurring between 45 and 64 years of age, FTLD represents the second common cause of dementia in the presenile age group (< 65 years of age) [1]. FTLD is a clinical syndrome characterized by progressive deterioration in behavior, personality and/or language. Depending on the first and prevailing symptoms, there are three different clinical subtypes including the behavioral variant FTLD (bvFTLD) and two subtypes of primary progressive aphasia: progressive nonfluent aphasia (PNFA) and semantic dementia [2, 3]. In addition, movement disorder can also be observed in 10 to 15% of FTLD cases (corticobasal syndrome, parkinsonism and/or amyotrophic lateral sclerosis (ALS)) [4]. Given this phenotype variability, FTLD clinical diagnosis remains difficult and uneasy to establish with certainty [5]. However, genetics has allowed for a better stratification of FTLD spectrum. In fact, gene mutations also play an important role in FTLD with 30 to 50% of patients reporting a positive family history of FTD and 10 to 15% of patients corresponding to dominantly inherited form [6]. Firstly described are the MAPT mutations [7]. Mutations in the progranulin gene GRN were then found to be the most frequent mutations associated with FTLD [8, 9]. More recently, two studies demonstrated that expanded hexanucleotide GGGGCC repeats in a noncoding region of the chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) gene was responsible for a large proportion of both familial FTLD and ALS [10,

11]. Less frequently mutations in the valosin containing protein (VCP) gene or charged multivesicular body protein 2B (CHMP2B) gene are also found associated with FTLD [12, 13].

The definite diagnosis relies on neuropathological examination of the brain, the characteristics of these brain lesions and their molecular basis [14]. Indeed, as many neurodegenerative diseases, FTLD are characterized by the presence of protein aggregates in the affected brain regions. However, in contrast to the well-characterized nature of protein inclusions (A β plaques and neurofibrillary tangles) in Alzheimer's disease (AD), proteinaceous aggregates in FTLD can be formed of different proteins [15]. Thus, approximately 40% of FTLD cases display aggregates made of abnormally and hyperphosphorylated Tau proteins and constitute the FTLD-Tau subclass. However, most of FTLD brains are negative for Tau inclusions and exhibit neuronal cytoplasmic and/or nuclear inclusions immunoreactive for transactive response DNA binding protein 43 (TDP-43) and constitute the FTLD-TDP subclass [16, 17]. This latter is subdivided into FTLD-TDP-GRN (patients with mutations on GRN) and FTLD-TDP-C9ORF72 (patients with mutations on C9ORF72) [8–11]. To a lesser extent, another protein called FUS (Fused in Sarcoma protein) is found in aggregates that are Tau and TDP-43 negative [18, 19]. This subclass is thus named FTLD-FUS. Finally, inclusions negative for Tau, TDP-43 or FUS are observed in rare cases of FTLD and associated with ubiquitin-proteasome system related proteins (FTLD-UPS) [20].

Prior to the discovery of the main molecular actors of FTLD, studies described a partial or total loss of soluble or physiological Tau protein expression in both grey and white matter [21, 22]. This loss of Tau was originally found in a subset of dementia called DLHD for Dementia Lacking Distinctive Histopathology (renamed later FTLD-ni for FTLD with no inclusion) [23]. In 2006, most of these cases were reclassified as FTLD-U (presenting with ubiquitin positive inclusions) [24]. However, additional investigation with specific regards to this loss of Tau expression has not been reported since Zhukareva et al. in 2003. With the progress in genetics and neuropathology of FTLD, the question of whether this reduction of Tau expression is seldom remains ill-defined. In this study, we used western blot analysis to investigate human brain Tau protein expression in Control, AD, FTLD-Tau, FTLD-TDP-GRN, FTLD-TDP-C9ORF72, sporadic FTLD-TDP and sporadic FTLD-FUS brains. Remarkably, we demonstrated a huge reduction of all six human brain Tau isoforms only in a subset of FTLD-TDP brains with mutation on the GRN gene. Thus, our data clearly suggest that these specific cases, referred to as FTLD-TDP-GRN τ (l \square for low levels of Tau protein), could be part of the current classification as a distinct entity with more severe synaptic dysfunction and astrogliosis.

Materials and Methods

Frontal cortical brain tissues from Controls (n=8), AD (n=8), FTLN-Tau (n=6), FTLN-TDP-GRN (n=10), FTLN-TDP-C9ORF72 (n=10), sporadic FTLN-TDP (n=8) and sporadic FTLN-FUS (n=5) were provided from both Lille Neurobank and GIE NeuroCeb in Paris. The brain banks fulfill criteria from the French Law on biological resources including informed consent, ethics review committee and data protection (article L1243-4 du Code de la Santé publique, August 2007).

Biochemical analysis

Frontal grey matter necropsic tissues (around 100 mg) were homogenized in UTS buffer (Urea 8M, Thiourea 2M, SDS 2%) using a tissue grinder Potter-Elvehjem with a PTFE Pestle. The homogenate was further sonicated on ice and spun at 7500×g during 10 min to remove tissue debris. The supernatant was kept at -80°C until use. Protein amount was determined by Bradford protein assay, subsequently diluted in NuPAGE® lithium dodecyl sulfate (LDS) 4x sample buffer (glycerol 40%, LDS 4%, Ficoll 400 4%, Triethanolamine chloride 800mM, phenol red 0.025% and Coomassie G250 0.025%, EDTA disodium 2 mM, pH 7.6) supplemented with NuPAGE® sample reducing agents (Invitrogen) and loaded onto 4-12% NuPAGE® Bis-Tris Novex Gels. Proteins were transferred on nitrocellulose membrane of 0.45 µM porosity (GE Lifesciences) using liquid transfer XCell II™ Blot Module, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). After saturation for 30 min at room temperature with TNT (Tris 15 mM, pH 8, NaCl 140 mM, Tween 0.05%) added with 5% skimmed milk powder or 5% BSA, membranes were rinsed three times 10 min with TNT and thereafter incubated with primary and secondary horseradish peroxidase-coupled antibodies. All primary antibodies and dilutions are listed in Table 1. The peroxidase activity was revealed using a chemiluminescence kit (ECL, GE Lifesciences) and an ImageQuant™ LAS4000 biomolecular imaging system (GE Lifesciences), according to the manufacturer's instructions. Quantifications were performed using ImageJ 1.46 software (NIH Software).

Sample preparation for two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE)

Frozen UTS brain samples (a total of 1.5 mg of protein for each condition) was unfrozen on ice and proteins were precipitated using chloroform/methanol precipitation [25]. The protein-dried pellet was resuspended in UTC buffer (Urea 8M, Thiourea 2M supplemented with 4% CHAPS) and kept at -80°C until use. Protein concentration was measured using Quick-Start Bradford Dye Reagent (Bio-Rad) and sample quality was evaluated by loading 15 µg of proteins onto 4-12% NuPAGE® Bis-Tris Novex Gels and stained with Coomassie R-250 (Biorad).

2D-DIGE

The 2D-DIGE was performed as previously described [25]. Briefly, 50 µg of protein was covalently coupled with 400 pmol of cyanine dyes diluted in dimethylformamide, according to the manufacturer's instructions (CyDIGE, GE Lifesciences). Each sample was labeled with either Cy3 or Cy5 fluorescent dyes (GE Lifesciences) and kept for 1h at 4°C in darkness. Cross-labeling with either Cy3 or Cy5 dyes was performed in order to avoid a preferential coupling of one cyanine to a sample. A pool of both samples containing equal amount of protein (50 µg in total) was labeled with Cy2 fluorescent dye and used as internal standard in accordance with the manufacturer's instructions (GE Lifesciences). Finally, the internal standard labeled with Cy2 and the samples labeled with either Cy3 or Cy5 were pooled and the final volume was adjusted to 350 µL by the addition of rehydration buffer [Urea 8M, Thiourea 2M, CHAPS 2%, Destreak reagent 1.1% (GE Lifesciences), IPG buffer pH 3-11 1.2% (GE Lifesciences), bromophenol blue 0.01%]. Samples were prepared in quadruplicate and loaded onto four independent IPG strips. Eighteen cm long linear pH gradient of 3-11 IPG strips (GE Lifesciences) were rehydrated overnight with the samples in a rehydration cassette recovered with mineral oil. Excess or mineral oil was discarded and isoelectrofocalisation was achieved using IPGphor isoelectric focusing apparatus (GE Lifesciences). A seven steps procedure was applied with the following conditions: 150 V for 1h, 200 V for 5h, 200 V to 500 V step gradient for 2h, 500 to 1000 V step gradient for 2h, 1000 V to 4000 V gradient for 2h, and finally 8000 V gradient for 2h. Current was limited to 50 µA per strip. Strips were then equilibrated in equilibration buffer (Urea 6M, SDS 2%, Glycerol 30%, Tris-HCl 50 mM, pH 8.6) with successively 1% DTT (dithiothreitol) and 4.7% iodoacetamide for 15 min. Proteins were then separated in the second dimension on 1 mm-thick 12% SDS-PAGE gels in an ETTAN DALTSix system (GE Lifesciences). Gels were run at 2.5 W per gel overnight. Fluorescently labeled protein spots were visualized using a Typhon FLA 9500 imager (GE Lifesciences). Gels were scanned at

Annexes

200 μm resolution and images were exported for further analysis using SameSpots (TotalLab) software.

Data analysis

Spot detection and relative quantification of spot intensity were analyzed using 2-DIGE analysis software package SameSpots (TotalLab). One-way ANOVA statistical test was applied and expression change was considered as significant with an exact p-value below 0.05. Normalization across all gels was performed using the internal standard.

Preparative 2D gels

In order to identify proteins of interest, two preparative 2D-gels with respectively 500 μg of brain protein of each condition were performed. After electrophoresis, gels were fixed in ethanol 30%, orthophosphoric acid (OPA) 2% overnight. Following washing in OPA 2%, gels were incubated 30 min in pre-coloration buffer (ethanol 18%, OPA 2% and ammonium sulfate 0.9M) before Coomassie blue staining (Brilliant Blue G-250, Bio-Rad) for 48h.

Trypsin digestion, mass spectrometry and protein identification

Spot labelling shown to be significantly different between two conditions after SameSpots analyses was manually excised from preparative gels. Each separate spot was incubated in DTT 10mM and alkylated (iodoacetamide 55mM) before trypsin digestion (Promega) overnight at 37°C, according to the manufacturer's instructions. Supernatants, containing digested peptides, were dried using centrifuge vacuum (Concentrator 5301, Eppendorf) and resuspended in ultra-pure water supplemented with trifluoroacetic acid (TFA) 0,1%. The resulting peptide mixture was spotted onto a MALDI plate with freshly dissolved α -cyano-4-hydroxycinnaminic acid (10 mg/ml in acetonitrile 50%, TFA 0.1%). Mass spectrometry was achieved with a MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics). MS and MS/MS data were analyzed with BioTools software and peptides sequences were analyzed with Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). A mascot score above 61 was considered significant for protein identification.

mRNA extraction and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis

Total RNA was extracted from the tissue of the frontal cortex and purified using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. For each RNA sample,

Annexes

integrity (RIN, RNA Integrity Number) was assessed on 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using the RNA 6000 nano kit according to the manufacturer protocol..

One microgram of total RNA was reverse-transcribed using Applied Biosystems High Capacity cDNA reverse transcription kit. RT-qPCR analysis was performed using an Applied Biosystems Prism 7900 SYBR Green PCR Master Mix. The amplification conditions were as follows: initial step of 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of a 2-step PCR consisting of a 95°C denaturing step for 15 seconds followed by a 60°C extension step for 25 seconds. Primers used were: Tau 5'UTR 5'ACAGCCACCTTCTCCTCCTC3' and 5' GATCTTCCATCACTTCGAACTCC3'; Tau E11-12 5'ACCAGTTGACCTGAGCAAGG3' and 5' AGGGACGTGGGTGATATTGT3' and RPLP0 5'GCAATGTTGCCAGTGTCTG3' and 5' GCCTTGACCTTTTCAGCAA3'. Amplifications were carried out in triplicate and the relative expression of target genes was determined by the $\Delta\Delta CT$ method [26].

Statistical analysis

For western blot and RT-qPCR statistical analyses, the non-parametric Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test were performed. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6 program (GraphPad Software) and statistical significance was set at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Results

Neuropathology

Neuropathological assessment of all cases was performed in the departments of anatomopathology of CHU-Lille and Hôpital Pitié-Salpêtrière. Detailed information on pathology and demographic data are summarized in Table 2.

Reduction of Tau protein expression is observed in FTLD-TDP brains associated with GRN gene mutation without Tau mRNA decrease

Tau protein expression was studied in all cases. We first checked by western-blotting, if there was any Tau pathology in these brains, since it has been described in AD, and a subset of FTLD-TDP patients [27,28]. Lack of phospho-Tau immunoreactivity was a condition to exclude Tau pathology and therefore any FTLD-Tau as compared with FTLD-MAPT and AD (data not shown). Thereafter, Tau expression was investigated by using antibodies targeting Tau protein independently of its phosphorylation state to evaluate total Tau protein level. These well-characterized antibodies either target the amino-terminal (Tau N-ter), the median (Tau 5) or carboxy-terminal epitope of Tau (Tau C-ter). In adult human brain, six Tau isoforms are expressed from MAPT gene through alternative mRNA splicing [28]. These six Tau isoforms give rise to a unique biochemical signature made of three bands (Fig. 1a, Control patients 1 to 3). Thus, western blot analysis highlighted significant decrease of all six Tau isoforms in 8 FTLD-TDP brains compared to control, AD and other FTLD brains (patients 22 to 29, Fig. 1a). Interestingly, this decrease is observed with all three Tau antibodies suggesting that Tau holoprotein isoform expression is impaired (Fig. 1a, compare patient 25 with patient 33). More interestingly, this reduction of Tau protein expression is restricted to FTLD-TDP brains associated with mutations on the GRN gene (Fig. 1a and b) and not associated with other FTLD-related gene mutations. Indeed, Tau protein expression in FTLD-TDP-C9ORF72, sporadic FTLD-TDP or FTLD-FUS patients is rather homogeneous from one patient to another with each antibody (Fig. 1a). Consequently to these results, GRN cases with reduced Tau protein levels were designated as FTLD-TDP-GRN τ and other FTLD-TDP cases with conserved Tau protein expression as FTLD-TDP τ .

This reduced Tau protein level could result from a lower transcription of MAPT gene in these brains. However, RT-qPCR using primers targeting constitutively Tau mRNA encoded sequences [5' UTR and exons 11-12 (E11-12)] revealed no significant decrease in total Tau mRNA level whatever the neuropathological group considered (Supplementary Fig. 1). Therefore,

consistent with previous data published in 2001 [21], these data confirm a reduction in Tau protein expression that cannot be explained by a MAPT gene transcription modification. But more interestingly, herein we show that this decrease in Tau protein expression is restricted to patients with GRN mutations.

FTLD-TDP-GRN τ brains display more astrogliosis and neuronal dysfunction compared to other FTLD-TDP τ brains

Since Tau protein level is reduced but not mRNA, we investigated if other proteins could be modified. We therefore performed a quantitative proteomic analysis using 2D-DIGE to evaluate any dysregulation of other protein expression. For this purpose, proteomes of FTLD-TDP τ brains (n=3, cases 14, 15 and 16) and FTLD-TDP-GRN τ (n=3, cases 22, 24 and 25) were compared. Following bioinformatics assisted analysis of 2D-DIGE gels (n=4), 26 protein spots with significant differential level of expression between FTLD-TDP-GRN τ and FTLD-TDP τ brains were isolated for further identification (Fig. 2a, 2b; Table 3). According to the mass spectrometry analysis, 20 distinct proteins including 6 isoforms of the same protein were identified. Among the 20 proteins identified with a significant mascot score (> 61), the amount of 7 proteins decreased while that of 13 increased in FTLD-TDP-GRN τ (Table 3). 11 proteins which intensity varies belong to proteins involved in metabolism (Table 3). Stress-related protein HSP-70.1 and structural proteins such as Gelsolin and Neurofilament light chain showed an increased expression (Table 3). A decrease of UCHL1 (spot 976, -1.3 fold change), a neuronal enzyme involved in ubiquitinated proteins processing, was also found (Table 3). Interestingly, decrease and modification in proteins involved in synaptic function (STXB1, DPYL2 and GLNA gene product in spot 448, 481, 689 with -1.3, -1.3 and -1.2 fold change, respectively) were observed suggesting a stronger synaptic impairment in the FTLD-TDP-GRN τ group (Table 3). Regarding glial cells, a decrease in glutamine synthetase (GS; astrocytic enzyme involved in glutamate metabolism) was observed with a -1.2 fold change, whereas the highest fold change (+3.2) was related to four spots corresponding to GFAP (Table 3). Taken together, these data demonstrate a strong correlation between reduction of Tau protein expression, astrocytic and synaptic dysfunctions. Therefore, these proteomic data highlight quantitative dysregulation of protein expression other than Tau proteins in the brain from patients with FTLD-TDP bearing GRN mutations.

Proteomic results validation in brain samples highlight specific dysregulation in FTL-D-TDP-GRN τ brains

To validate these proteomic results found in a subset of patients, we therefore undertook an analysis of dysregulated neuronal and astrocytic proteins in all brain samples (FTLD-TDP-GRN τ , FTL-D-TDP τ and control) using western blot analysis. We first confirmed an increase in HSP-70 protein level in FTL-D-TDP-GRN τ cases (Fig. 3a, b). Very strikingly, we observed as in 2D-DIGE, an upsurge in GFAP expression in FTL-D-TDP-GRN τ group in comparison with both control and other FTL-D-TDP cases (Fig. 3a, b). Noteworthy, GS was found to be dramatically decreased (Fig. 3a, b). With regards to synaptic proteins, several synaptic markers were decreased including α -synuclein and PSD-95 (Fig. 3a, b). These dysregulations found in FTL-D-TDP-GRN τ brains could be the reflect of a global proteome deterioration in these samples. We thus tested the level of several proteins such as Neuronal Specific Enolase (NSE), Aconitase, Histone H3 and Neurofilaments. Their levels remain unchanged among the different FTL-D subclasses (Supplementary Fig. 2). Finally, it is also worth noting that among FTL-D patients we could not find any correlation between Tau protein decrease, macroscopic atrophy, post-mortem delay (PMD) and RNA Integrity Number (RIN) (Table 2, Supplementary Fig. 3a, b, c respectively). All these results provide further evidence that specific dysregulations affect FTL-D-TDP-GRN τ patients such as dramatic synaptic impairment and massive reactive astrogliosis.

Discussion

For the first time since Zhukareva's studies, our data clearly demonstrate that the reduced Tau protein expression is restricted to FTL-D-TDP brains with mutations on GRN gene. Although several FTL-D brains display a lower Tau protein level with Tau C-ter antibody, the labelling obtained with N-ter and Tau 5 shows a relative conservation of Tau protein expression suggesting a preferential degradation of Tau at the C-terminal part in these cases. In contrast, FTL-D-TDP-GRN τ brains exhibit reduced Tau levels with all Tau antibodies tested.

Consistent with previous studies, reduction of Tau protein expression is unlikely to result from extensive neuronal loss as demonstrated by the preserved expression of several specific neuronal proteins [21, 22]. Moreover, we could not find any correlation between reduced Tau level and PMD, RIN or cortical atrophy. Finally, downregulation of MAPT transcription does not appear to be responsible for this decrease in Tau since mRNA level remains unchanged in these FTL-D-

TDP-GRN τ brains. Therefore, reduction of Tau protein might rather result from post-transcriptional dysregulations.

TDP-43, the main constituent of aggregates found in FTLN-TDP-GRN τ cases, is involved in RNA metabolism and especially in mRNA transport and stability through 3'UTR binding of targeted transcripts (see [29–31] for review). Notably, a recent study showed that loss of TDP-43 function impairs microtubule-dependent transport of mRNA granules towards distal neuronal compartment [32]. Regarding axonal translation of Tau [33], loss of TDP-43 function may lead to deficient Tau protein translation. Nevertheless, this hypothesis suggests specific pathophysiological process in FTLN-TDP-GRN τ when compared to other FTLN-TDP cases that do not display change in Tau protein level.

MicroRNAs (miRNAs) play a key role in both normal aging and neurodegenerative diseases (see [34, 35] for review). Interestingly, studies have reported that different miRNA are able to modulate Tau metabolism [36, 37]. Among them, miR-219 is particularly interesting since it modulates Tau protein translation with relatively low influence on total Tau mRNA level. Consistent with this study, it is worth noting that TDP-43 is also involved in miRNA biogenesis [38], suggesting that specific miRNA deregulation could lead to a reduction of Tau mRNA translation in FTLN-TDP-GRN τ brains. Finally, emerging evidences indicate that Tau is physiologically released into extracellular space through multiple mechanisms such as multivesicular body and ectosome secretion [39]. It could therefore be interesting to evaluate Tau protein level in cerebrospinal fluid to see if an increase in Tau secretion participates to this reduction of Tau protein expression.

All FTLN-TDP-GRN τ cases display mutation on the GRN gene. It is well established that mutations on GRN gene induce haploinsufficiency with approximately 50% reduction in mRNA levels and 33% in protein level [8]. However, how progranulin haploinsufficiency leads to neurodegeneration is still unclear, in part due to the lack of progranulin-deficient models recapitulating FTLN hallmarks. Progranulin is a secreted protein widely expressed throughout the body that exerts numerous functions during development, tumor proliferation and inflammation (see [40, 41] for review). In adult brain, progranulin is mostly found in neurons and activated microglia [42] where it regulates neurite outgrowth [43], synapse biology [44], stress response [45] and lysosomal function [46]. All these data suggest a strong role of progranulin in neurodegenerative diseases but how can we relate the reduction of Tau with GRN mutations? Depending on the mutation, we observed very distinct phenotype between cases. Indeed, cases affected by a total deletion of one GRN allele do not display any decrease in Tau expression whereas other point

mutations are associated with a huge reduction of all 6 isoforms. This result is remarkable and suggests for the first time that different mutations can induce distinct phenotype and not only haploinsufficiency. Indeed, homozygous deletion of GRN does not lead to FTLN-TDP but to another disorder called Neuronal Ceroid Lipofuscinosis (NCL) which is characterized by lysosomal dysfunction [46]. Thus, a recent study has demonstrated that specific granulin expression, resulting from progranulin extracellular cleavage, could have toxic effect [47]. These point mutations could lead to modified mRNA leading to the production of toxic granulins. However, the lack of information on the different granulins, and their functions are still unknown and the relationship with Tau metabolism, if any, remains to be experimentally established.

Reduction of Tau protein expression in FTLN-TDP-GRN τ brains is intriguing since Tau has essential functions in neuron. Indeed, Tau protein is a microtubule associated protein (MAP) which mainly distributes into axons [48] and was originally described as a protein regulating the assembly and stabilization of microtubules [49, 50], therefore modulating axonal transport [51]. However, recent studies have highlighted a role for Tau in synaptic [52, 53] and nuclear compartments [54, 55]. Although initial studies showed that tau-knockout mice develop no evident pathology, probably through MAP1A compensatory effect [56], recent studies have revealed several pathological modifications in these knockout mice suggesting that Tau is essential for neuronal activity [57], iron export [58], neurogenesis [59] and both long-term depression and long-term potentiation [60, 61]. Regarding our results, it would not be surprising that decrease in Tau protein expression leads to neuronal dysfunction.

This hypothesis is strengthened by our 2D-DIGE analysis and biochemical validation, demonstrating that expression of several neuronal proteins is either up- or down-regulated. Indeed, both pre- and post-synaptic proteins such as PSD-95, Munc-18, α -synuclein, synaptophysin and syntaxin-binding protein 1 are highly reduced in FTLN-TDP-GRN τ brains in comparison to control and FTLN-TDP τ brains. It's interesting to note that a very recent study has described a link between synaptic dysfunction and progranulin deficiency [62]. Indeed, progranulin deficiency is able to induce synaptic pruning through lysosome dysfunctions and complement activation. It could explain, in part, the dramatic synaptic loss we found in FTLN-TDP-GRN τ brains, in whom progranulin levels are very low. Finally, regarding downregulation of dihydropyrimidinase-related protein 2 (DPYSL2), also called collapsin response mediator protein-2 (CRMP2), it should be noted that this protein serves important functions in synaptic plasticity. Moreover, CRMP2 and Tau are both high-abundance microtubule-associated proteins, and overlap in terms of functional regulation

[63]. All these data demonstrate that synaptic functions are impaired in these FTLN-TDP-GRN τ brains.

In parallel with these neuronal dysfunctions, an increase in GFAP expression is also observed in FTLN-TDP-GRN τ brains. GFAP belongs to intermediate filaments and is expressed mostly in astrocytes. These glial cells are complex highly differentiated cells that perform numerous essential functions in central nervous system (CNS), such as synaptic function and plasticity and maintenance of the neuronal microenvironment homeostasis [64]. Astrocytes respond to various forms of CNS injury such as infections, ischemia or neurodegenerative diseases through a process referred to as reactive astrogliosis and often characterized by an increase in GFAP expression [65]. Although a mild to moderate reactive astrogliosis represents a protective mechanism, severe astrogliosis could lead to functional defects including alteration of astrocyte ability to control neuronal microenvironment homeostasis [66, 67]. Interestingly in FTLN-TDP-GRN τ brains, a decrease in GS expression has been found. This astrocytic enzyme that converts glutamate into glutamine is frequently deregulated in neurodegenerative diseases presenting with Tau modification [68, 69]. Thus, our results indicate that decrease in GS may underlie glutamate homeostasis alteration, leading to more severe failures in synaptic connectivity and transmission in FTLN-TDP-GRN τ brains. However, why it is limited to cases presenting with point mutations of GRN still remains unclear. Beside this, we also found numerous deregulated proteins related to glycolytic metabolism suggesting a critical role for alterations in brain metabolism and energetics in neurodegenerative processes. Therefore, metabolism dysregulation could reflect a more severe pathological state in these brains.

To conclude, our data reveal that reduction in Tau protein expression is a specific feature of FTLN-TDP cases with GRN mutation, suggesting that FTLN-TDP-GRN τ cases could represent a distinct subclass in the current FTLN classification. Moreover, proteomic results clearly demonstrate that in addition to a decrease in Tau protein expression, FTLN-TDP-GRN τ cases also displayed astrocytic and synaptic dysfunctions explaining more severe physiopathological processes. However, we are not currently able to explain this particular feature in part due to the nature of samples, which are post-mortem tissues, and make these dynamic mechanisms investigation complex. If reduced Tau level is a consequence or an actor of deregulations found in these brains remains to be determined and will require development of both in vitro and in vivo models. Finally, further proteomic investigations will also help us to better characterize and understand this particular subclass of FTLN-TDP.

Acknowledgments

AP received a PhD scholarship from University of Lille 2. This work was supported by LabEx DISTALZ, CNRS and France Alzheimer Association. We would like to thank the Lille Neurobank and GIE Neuroceb, Paris for providing human brain tissues. We would also like to thank Raphaëlle Caillierez and Florent Sauve for their technical assistance.

References

1. Rabinovici G, Miller B: Frontotemporal lobar degeneration: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management. *CNS Drugs* 2010; 24:375–398.
2. Chare L, Hodges JR, Leyton CE, McGinley C, Tan RH, Kril JJ, Halliday GM: New criteria for frontotemporal dementia syndromes: clinical and pathological diagnostic implications. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85:865–70.
3. Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, Ogar JM, Rohrer JD, Black S, Boeve BF, Manes F, Dronkers NF, Vandenberghe R, Rascovsky K, Patterson K, Miller BL, Knopman DS, Hodges JR, Mesulam MM, Grossman M: Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology* 2011; 76:1006–1014.
4. Burrell JR, Kiernan MC, Vucic S, Hodges JR: Motor neuron dysfunction in frontotemporal dementia. *Brain* 2011; 134:2582–2594.
5. Neary D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, Freedman M, Kertesz a, Robert PH, Albert M, Boone K, Miller BL, Cummings J, Benson DF: Frontotemporal lobar degeneration A consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51:1546–1554.
6. Seelaar H, Kamphorst W, Rosso SM, Azmani A, Masdjedi R, De Koning I, Maat-Kievit JA, Anar B, Kaat LD, Breedveld GJ, Dooijes D, Rozemuller JM, Bronner IF, Rizzu P, Van Swieten JC: Distinct genetic forms of frontotemporal dementia. *Neurology* 2008; 71:1220–1226.
7. Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs a, Grover a, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed L a, Trojanowski J, Basun H, et al.: Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998; 393:702–705.
8. Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, Snowden J, Adamson J, Sadovnick a D, Rollinson S, Cannon A, Dwosh E, Neary D, Melquist S, Richardson A, Dickson D, Berger Z, Eriksen J, Robinson T, Zehr C, Dickey C a, Crook R, McGowan E, Mann D, Boeve B, Feldman H, Hutton M: Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006; 442:916–9.
9. Cruts M, Gijselinck I, van der Zee J, Engelborghs S, Wils H, Pirici D, Rademakers R, Vandenberghe R, Dermaut B, Martin JJ, van Duijn C, Peeters K, Sciot R, Santens P, De Pooter T,

Mattheijssens M, Van den Broeck M, Cuijt I, Vennekens K, De Deyn PP, Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C: Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006; 442:920–924.

10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch N a, Flynn H, Adamson J, Kouri N, Wojtas A, Sengdy P, Hsiung G-YR, Karydas A, Seeley WW, Josephs K a, Coppola G, Geschwind DH, Wszolek ZK, Feldman H, Knopman DS, Petersen RC, Miller BL, Dickson DW, Boylan KB, Graff-Radford NR, Rademakers R: Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72:245–56.

11. Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Rytan M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, et al.: A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72:257–268.

12. Watts GDJ, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP, Kimonis VE: Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 2004; 36:377–381.

13. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, Nielsen JE, Hodges JR, Spillantini MG, Thusgaard T, Brandner S, Brun A, Rossor MN, Gade A, Johannsen P, Sørensen SA, Gydesen S, Fisher EM, Collinge J: Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet* 2005; 37:806–808.

14. Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IRA, Schneider JA, Paulo UDS, Paulo S, Halliday G, Escourolle LDN, Salpêtrière HD La, Lowe JS: Neuropathological diagnostic and nosologic criteria for FTLD : consensus of the Consortium for FLTD. *Acta Neuropathol* 2010; 114:5–22.

15. Rademakers R, Neumann M, Mackenzie IR: Advances in understanding the molecular basis of frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurol* 2012; 8:423–34.

16. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretschmar H a, Trojanowski JQ, Lee VM-Y: Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314:130–3.

17. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, Mann D, Tsuchiya K, Yoshida M, Hashizume Y, Oda T: TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351:602–611.

18. Neumann M, Rademakers R, Roeber S, Baker M, Kretschmar HA, MacKenzie IRA: A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain* 2009; 132:2922–2931.

19. Urwin H, Josephs KA, Rohrer JD, MacKenzie IR, Neumann M, Authier A, Seelaar H, Van Swieten JC, Brown JM, Johannsen P, Nielsen JE, Holm IE, Dickson DW, Rademakers R, Graff-Radford NR, Parisi JE, Petersen RC, Hatanpaa KJ, White CL, Weiner MF, Geser F, Van Deerlin

VM, Trojanowski JQ, Miller BL, Seeley WW, Van Der Zee J, Kumar-Singh S, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, et al.: FUS pathology defines the majority of tau-and TDP-43-negative frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol* 2010; 120:33–41.

20. Holm IE, Isaacs AM, MacKenzie IRA: Absence of FUS-immunoreactive pathology in frontotemporal dementia linked to chromosome 3 (FTD-3) caused by mutation in the CHMP2B gene. *Acta Neuropathol* 2009; 118:719–720.

21. Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Van Deerlin VM, Bruce J, Shuck T, Grossman M, Clark CM, Arnold SE, Masliah E, Galasko D, Trojanowski JQ, Lee VM: Loss of brain tau defines novel sporadic and familial tauopathies with frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 2001; 49:165–75.

22. Zhukareva V, Sundarraj S, Mann D, Sjogren M, Blenow K, Clark CM, McKeel DW, Goate A, Lippa CF, Vonsattel J-P, Growdon JH, Trojanowski JQ, Lee VM-Y: Selective reduction of soluble tau proteins in sporadic and familial frontotemporal dementias: an international follow-up study. *Acta Neuropathol* 2003; 105:469–76.

23. Mackenzie IRA, Neumann M, Bigio EH, Cairns NJ, Alafuzoff I, Kril J, Kovacs GG, Ghetti B, Halliday G, Holm IE, Ince PG, Kamphorst W, Revesz T, Rozemuller AJM, Kumar-Singh S, Akiyama H, Baborie A, Spina S, Dickson DW, Trojanowski JQ, Mann DMA: Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: Consensus recommendations. *Acta Neuropathol* 2009; 117:15–18.

24. Mackenzie IRA, Shi J, Shaw CL, DuPlessis D, Neary D, Snowden JS, Mann DMA: Dementia lacking distinctive histology (DLDH) revisited. *Acta Neuropathol* 2006; 112:551–559.

25. Fernandez-Gomez F-J, Jumeau F, Derisbourg M, Burnouf S, Tran H, Eddarkaoui S, Obriot H, Dutoit-Lefevre V, Deramecourt V, Mitchell V, Lefranc D, Hamdane M, Blum D, Buée L, Buée-Scherrer V, Sergeant N: Consensus brain-derived protein, extraction protocol for the study of human and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting. *J Vis Exp* 2014; 3:1–8.

26. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method. *Methods* 2001; 25:402–408.

27. Behrouzi R, Liu X, Wu D, Robinson AC, Tanaguchi-Watanabe S, Rollinson S, Shi J, Tian J, Hamdalla HHM, Ealing J, Richardson A, Jones M, Pickering-Brown S, Davidson YS, Strong MJ, Hasegawa M, Snowden JS, Mann DMA: Pathological tau deposition in Motor Neurone Disease and frontotemporal lobar degeneration associated with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol Commun* 2016; 4:33.

28. Buée L, Bussière T, Buée-Scherrer V, Delacourte a, Hof PR: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 33:95–130.

29. Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW: TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2010; 19:R46–64.

30. Chen-plotkin AS, Lee VM, Trojanowski JQ: TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. 2010; 6:211–220.

31. Lee EB, Lee VM-Y, Trojanowski JQ: Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13:38–50.
32. Alami NH, Smith RB, Carrasco MA, Williams LA, Winborn CS, Han SSW, Kiskinis E, Winborn B, Freibaum BD, Kanagaraj A, Clare AJ, Badders NM, Bilican B, Chaum E, Chandran S, Shaw CE, Eggan KC, Maniatis T, Taylor JP: Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron* 2014; 81:536–543.
33. Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I: Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* 2001; 21:6577–87.
34. Piscopo P, Albani D, Castellano AE, Forloni G, Confaloni A: Frontotemporal Lobar Degeneration and MicroRNAs. *Front Aging Neurosci* 2016; 8:1–7.
35. Gascon E, Gao FB: Cause or effect: Misregulation of microRNA pathways in neurodegeneration. *Front Neurosci* 2012; 6:1–10.
36. Smith PY, Hernandez-Rapp J, Jolivet F, Lecours C, Bisht K, Goupil C, Dorval V, Parsi S, Morin F, Planel E, Bennett DA, Fernandez-Gomez F-J, Sergeant N, Buée L, Tremblay M-È, Calon F, Hébert SS: miR-132/212 deficiency impairs tau metabolism and promotes pathological aggregation in vivo. *Hum Mol Genet* 2015; 24:6721–6735.
37. Santa-Maria I, Alaniz ME, Renwick N, Cela C, Fulga TA, Van Vactor D, Tuschl T, Clark LN, Shelanski ML, McCabe BD, Crary JF: Dysregulation of microRNA-219 promotes neurodegeneration through post-transcriptional regulation of tau. *J Clin Invest* 2015; 125:681–6.
38. Kawahara Y, Mieda-Sato A: TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:3347–52.
39. Dujardin S, Begard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, Loyens A, Galas MC, Bousset L, Melki R, Auregan G, Hantraye P, Brouillet E, Buee L, Colin M: Ectosomes: A new mechanism for non-exosomal secretion of Tau protein. *PLoS One* 2014; 9:28–31.
40. Petkau TL, Leavitt BR: Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci* 2014, 37:388–398.
41. Cenik B, Sephton CF, Cenik BK, Herz J, Yu G: Progranulin: A proteolytically processed protein at the crossroads of inflammation and neurodegeneration. *J Biol Chem* 2012; 287:32298–32306.
42. Petkau TL, Neal SJ, Orban PC, MacDonald JL, Hill a M, Lu G, Feldman HH, Mackenzie IR a, Leavitt BR: Progranulin expression in the developing and adult murine brain. *J Comp Neurol* 2010; 518:3931–3947.
43. Gass J, Lee WC, Cook C, Finch N, Stetler C, Jansen-West K, Lewis J, Link CD, Rademakers R, Nykjær A, Petrucelli L: Progranulin regulates neuronal outgrowth independent of sortilin. *Mol Neurodegener* 2012, 7:33.
44. Tapia L, Milnerwood A, Guo A, Mills F, Yoshida E, Vasuta C, Mackenzie IR, Raymond L, Cynader M, Jia W, Bamji SX: Progranulin deficiency decreases gross neural connectivity but enhances transmission at individual synapses. *J Neurosci* 2011; 31:11126–11132.

45. Almeida S, Zhang Z, Coppola G, Mao W, Futai K, Karydas A, Geschwind MD, Tartaglia MC, Gao F, Gianni D, Sena-Esteves M, Geschwind DH, Miller BL, Farese R V., Gao FB: Induced pluripotent stem cell models of progranulin-deficient frontotemporal dementia uncover specific reversible neuronal defects. *Cell Rep* 2012; 2:789–798.
46. Smith KR, Damiano J, Franceschetti S, Carpenter S, Canafoglia L, Morbin M, Rossi G, Pareyson D, Mole SE, Staropoli JF, Sims KB, Lewis J, Lin WL, Dickson DW, Dahl HH, Bahlo M, Berkovic SF: Strikingly different clinicopathological phenotypes determined by progranulin-mutation dosage. *Am J Hum Genet* 2012; 90:1102–1107.
47. Salazar D a., Butler VJ, Argouarch a. R, Hsu T-Y, Mason A, Nakamura A, McCurdy H, Cox D, Ng R, Pan G, Seeley WW, Miller BL, Kao a. W: The progranulin cleavage products, granulins, exacerbate TDP-43 toxicity and increase TDP-43 levels. *J Neurosci* 2015; 35:9315–9328.
48. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI: The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 1985; 101:1371–1378.
49. Drechsel DN, Hyman a a, Cobb MH, Kirschner MW: Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 1992; 3:1141–1154.
50. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW: A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72:1858–62.
51. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF: Differential regulation of Dynein and Kinesin motor proteins by Tau. *Science* 2010; 319:1086–1089.
52. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier I a, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J: Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer’s disease mouse models. *Cell* 2010; 142:387–97.
53. Mondragon-Rodriguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J: Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem* 2012; 287:32040–32053.
54. Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC: Nuclear Tau, a key player in neuronal DNA protection. *J Biol Chem* 2011; 286:4566–4575.
55. Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nessler F, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buée L, Galas M-C: A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:84.
56. Harada a, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N: Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 1994; 369:488–491.
57. Lei P, Ayton S, Moon S, Zhang Q, Volitakis I, Finkelstein DI, Bush AI: Motor and cognitive deficits in aged tau knockout mice in two background strains. *Mol Neurodegener* 2014; 9:29.
58. Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Spoerri L, Ciccotosto GD, Wright DK, Wong BXW, Adlard P a, Cherny R a, Lam LQ, Roberts BR, Volitakis I, Egan GF, McLean C a, Cappai R, Duce J a, Bush

AI: Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med* 2012; 18:291–295.

59. Fuster-Matanzo A, Llorens-Martín M, Jurado-Arjona J, Avila J, Hernández F: Tau protein and adult hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci* 2012; 6:1–6.

60. Ahmed T, Van der Jeugd A, Blum D, Galas MC, D’Hooge R, Buee L, Balschun D: Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging* 2014; 35:2474–2478.

61. Kimura T, Whitcomb DJ, Jo J, Regan P, Piers T, Heo S, Brown C, Hashikawa T, Murayama M, Seok H, Sotiropoulos I, Kim E, Collingridge GL, Takashima A, Cho K, B PTRS: Depression in the hippocampus Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369:1633

62. Lui H, Zhang J, Makinson SR, Paz JT, Barres BA, Huang EJ, Lui H, Zhang J, Makinson SR, Cahill MK, Kelley KW, Huang H: Progranulin deficiency promotes circuit-specific synaptic pruning by microglia via complement activation. *Cell* 2016; 165:921–935.

63. Hensley K, Kursula P: Collapsin Response Mediator Protein-2 (CRMP2) is a plausible etiological factor and potential therapeutic target in Alzheimer’s disease: Comparison and contrast with microtubule-associated protein tau. *J Alzheimer’s Dis* 2016; 53:1–14.

64. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA: New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 2003; 26:523–530.

65. Sofroniew M V.: Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 2009; 32:638–647.

66. Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C: Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:194–206.

67. Sofroniew M V., Vinters H V.: Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119:7–35.

68. Kulijewicz-Nawrot M, Syková E, Chvátal A, Verkhratsky A, Rodríguez JJ: Astrocytes and glutamate homeostasis in Alzheimer’s disease: a decrease in glutamine synthetase, but not in glutamate transporter-1, in the prefrontal cortex. *ASN Neuro* 2013; 5:273–82.

69. Hege Nilsen L, Rae C, Ittner LM, Götz J, Sonnewald U: Glutamate metabolism is impaired in transgenic mice with tau hyperphosphorylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33:684–91.

70. Sergeant N, Sablonnière B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage C a, Watzet A, Vermersch P, Delacourte A: Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 2001; 10:2143–55.

71. Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez F-J, Laurent C, Demeyer D, Carrier S, Buée-Scherrer V, Blum D, Vinh J, Sergeant N, Verdier Y, Buée L, Hamdane M: Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci Rep* 2015; 5:9659.

72. Flament S, Delacourte A, Hemon B, Defossez A: Characterization of two pathological Tau protein variants in Alzheimer brain cortices. *J Neurol Sci* 1989; 92:133–141.
73. Liu Y, Fallon L, Lashuel H a, Liu Z, Lansbury PT: The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111:209–218.
74. Du C-P, Tan R, Hou X-Y: Fyn kinases play a critical role in neuronal apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation or amyloid- β peptide treatment. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18:754–61.
75. Hata Y, Slaughter CA, Südhof TC: Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 1993; 366:347–351.
76. Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Fauré S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D: The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 2002; 16:2350–2364.
77. Wang YF, Sun MY, Hou Q, Parpura V: Hyposmolality differentially and spatiotemporally modulates levels of glutamine synthetase and serine racemase in rat supraoptic nucleus. *Glia* 2013; 61:529–538.
78. Johnson MA, Vidoni S, Durigon R, Pearce SF, Rorbach J, He J, Brea-Calvo G, Minczuk M, Reyes A, Holt IJ, Spinazzola A: Amino acid starvation has opposite effects on mitochondrial and cytosolic protein synthesis. *PLoS One* 2014; 9:4.
79. Jin Y, Elalaf H, Watanabe M, Tamaki S, Hineno S, Matsunaga K, Woltjen K, Kobayashi Y, Nagata S, Ikeya M, Kato T, Okamoto T, Matsuda S, Toguchida J: Mutant *idh1* dysregulates the differentiation of mesenchymal stem cells in association with gene-specific histone modifications to cartilage- and bone-related genes. *PLoS One* 2015; 10:1–15.

Legends of figures:

Fig. 1 Reduction of Tau protein expression in FTLD brains. (a) Western blot analysis of soluble Tau protein expression in control, AD and FTLD brains using antibodies targeting total Tau independently of any post-translational modification (N-ter, Tau 5 and C-ter). Are shown representative data from FTLD-TDP-GRN (n=10), FTLD-TDP-C9ORF72 (n=10), sporadic FTLD-TDP (n=8), sporadic FTLD-FUS (n=5), AD (n=8) and control brains (n=8). (b) Total Tau levels were quantified and normalized to a pool containing same protein amount of each control used in this study. Both full-length and truncated Tau species were considered for the quantification. Actin was used as loading control. Results are expressed as means \pm SEM. For statistical analysis the

Annexes

Kruskal-Wallis test was used (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). SEM: standard error of the mean.

Fig. 2 2D-DIGE analysis of FTLD-TDP-GRN τ and FTLD-TDP τ cases. Analysis of 2D-DIGE gels was performed using TotalLab SameSpot software. (a) Overlay of 2D-DIGE images with the two possible combinations. In the upper panel, FTLD-TDP-GRN τ pool is labeled with Cy3 (green) and FTLD-TDP τ brains with Cy5 (red). In the lower panel, FTLD-TDP-GRN τ pool is labeled with Cy5 (red) and FTLD-TDP τ brains with Cy3 (green). In both combination, the internal standard is labeled with Cy2 (blue). (b) 2D-DIGE map of proteins which are deregulated in FTLD-TDP-GRN τ samples compared to FTLD-TDP τ samples. Spots of interest (numbers) are listed and described in Table 3. kDa: kiloDalton; MW: molecular weight.

Fig. 3 Biochemical validation of 2D-DIGE results in control, FTLD-TDP-GRN τ and FTLD-TDP τ brain samples. (a) Western blot analysis of synaptic [PSD-95, α -synuclein (α -syn), Munc-18 and Synaptophysin (SYP)], astrocytic [GFAP and Glutamine Synthetase (GS)], and stress (HSP-70) related protein level in control, FTLD-TDP-GRN τ and FTLD-TDP τ brain samples. Representative data from FTLD-TDP-GRN τ (n=8), FTLD-TDP τ (n=20) and control brains (n=8) are presented. (b) Protein levels were quantified and normalized to a pool containing same protein amount of each control used in this study. Actin was used as loading control. Results are expressed as means \pm SEM. For statistical analysis the Kruskal-Wallis test was used (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). SEM: standard error of the mean.

Supplementary Fig. 1 Preservation of Tau mRNA in FTLD-TDP-GRN τ group. qPCR analysis was done on total Tau mRNA in control and FTLD brain samples. Both 5'UTR (Untranslated Region) and E11-12 (Exons 11-12) primers target regions present in all Tau transcripts. Data were normalized to the mean value of control cases with Large Ribosomal Protein P0 (RPLP0) used as reference gene. Results are expressed as means \pm SEM. For statistical analysis the Mann-Whitney test was used (ns non significant), n = 5-10/group. SEM: standard error of the mean.

Supplementary Fig. 2 Conservation of several proteins among the different FTLD subclasses. (a) Western blot analysis of NSE (Neuron Specific Enolase), Aconitase, Histone H3 and Heavy (NF-H)

Annexes

Neurofilaments protein level in control and FTL-D-U brain samples. Are shown representative data from FTL-D-TDP-GRN τ (n=8), FTL-D-TDP-C9ORF72 (n=10), sporadic FTL-D-TDP (n=8), sporadic FTL-D-FUS (n=5) and control brains (n=8). (b) Protein levels were quantified and normalized to a pool containing same protein amount of each control used in this study. Actin was used as loading control. Results are expressed as means \pm SEM. For statistical analysis the Kruskal-Wallis test was used (ns non significant). SEM: standard error of the mean.

Supplementary Fig. 3 Reduction of Tau protein expression does not result from greater post-mortem delay, aberrant RIN or cortical atrophy in FTL-D-TDP-GRN τ brains. (a) Fixed hemibrain weight, (b) post-mortem delay and (c) RIN (RNA Integrity Number) of FTL-D-TDP-GRN τ , FTL-D-TDP-C9ORF72, sporadic FTL-D-TDP, sporadic FTL-D-FUS and control brains. Results are expressed as means \pm SEM. For statistical analysis the Kruskal-Wallis test was used (*p < 0.05; ns non significant). a.u, arbitrary unit; SEM: standard error of the mean.

Autre publication

Tau Monoclonal Antibody Generation Based on Humanized Yeast Models

IMPACT ON TAU OLIGOMERIZATION AND DIAGNOSTICS*

Received for publication, November 23, 2014, and in revised form, December 24, 2014. Published, JBC Papers in Press, December 24, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.627919

Joëlle Rosseels,^{a1} Jeff Van den Brande,^{a,b,c1} Marie Violet,^{d,e,f1} Dirk Jacobs,^b Pierre Grognet,^{c2} Juan Lopez,^{g,h} Isabelle Huvent,^{g,h} Marina Caldara,^a Erwin Swinnen,^a Anthony Papegaey,^{d,e,f} Raphaëlle Caillierez,^{d,e,f} Valerie Buée-Scherrer,^{d,e,f} Sebastiaan Engelborghs,^{i,j} Guy Lippens,^{g,h} Morvane Colin,^{d,e,f} Luc Buée,^{d,e,f} Marie-Christine Galas,^{d,e,f} Eugeen Vanmechelen,^{b,3} and Joris Winderickx^{a4}

From ^aFunctional Biology, KU Leuven, Kasteelpark Arenberg 31 Box 2433, 3001 Heverlee, Belgium, ^bADx NeuroSciences NV, Technologiepark Zwijnaarde 4, 9052 Ghent, Belgium, ^cFujirebio Europe, Technologiepark Zwijnaarde 6, 9052 Ghent, Belgium, ^dINSERM, UMR1172, JPArc, Alzheimer & Tauopathies, Rue Polonovski, 59045 Lille, France, the ^eFaculté de Médecine, Université de Lille, Place de Verdun, 59045 Lille, France, the ^fMemory Clinic, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, 59037 Lille, France, ^gUniversité Lille Nord de France, 59000 Lille, France, ^hCNRS, UMR8576 Structural and Functional Glycobiology, 59650 Villeneuve d'Ascq, France, the ⁱReference Center for Biological Markers of Dementia (BIODEM), Institute Born-Bunge, University of Antwerp, 2610 Wilrijk, Belgium, and the ^jDepartment of Neurology and Memory Clinic, Hospital Network Antwerp (ZNA) Middelheim and Hoge Beuken, 2660 Antwerp, Belgium

Background: Oligomers of protein Tau are associated with neurodegenerative diseases.

Results: New antibodies were generated and validated that recognize different degrees of oligomerization of protein Tau.

Conclusion: Low order and higher order oligomers differ in C-terminal Tau phosphorylation and reflect consecutive stages in disease progression.

Significance: Antibodies recognizing Tau oligomers provide insight into disease etiology and are promising diagnostic tools.

A link between Tau phosphorylation and aggregation has been shown in different models for Alzheimer disease, including yeast. We used human Tau purified from yeast models to generate new monoclonal antibodies, of which three were further characterized. The first antibody, ADx201, binds the Tau proline-rich region independently of the phosphorylation status, whereas the second, ADx215, detects an epitope formed by the Tau N terminus when Tau is not phosphorylated at Tyr¹⁸. For the third antibody, ADx210, the binding site could not be deter-

mined because its epitope is probably conformational. All three antibodies stained tangle-like structures in different brain sections of THY-Tau22 transgenic mice and Alzheimer patients, and ADx201 and ADx210 also detected neuritic plaques in the cortex of the patient brains. In hippocampal homogenates from THY-Tau22 mice and cortex homogenates obtained from Alzheimer patients, ADx215 consistently stained specific low order Tau oligomers in diseased brain, which in size correspond to Tau dimers. ADx201 and ADx210 additionally reacted to higher order Tau oligomers and presumed prefibrillar structures in the patient samples. Our data further suggest that formation of the low order Tau oligomers marks an early disease stage that is initiated by Tau phosphorylation at N-terminal sites. Formation of higher order oligomers appears to require additional phosphorylation in the C terminus of Tau. When used to assess Tau levels in human cerebrospinal fluid, the antibodies permitted us to discriminate patients with Alzheimer disease or other dementia like vascular dementia, indicative that these antibodies hold promising diagnostic potential.

* This work was supported by grants from the Research Foundation Flanders (FWO-Vlaanderen) (to J. W. and S. E.), KU Leuven Research Fund (KU Leuven-BOF; KU Leuven-IOF), KU Leuven R&D (to J. W.), and the Agency for Innovation by Science and Technology (IWT) (to J. W., E. V., and S. E.). This work was also supported by an IWT Ph.D. fellowship (to J. V. d. B.) and FWO-Vlaanderen postdoctoral fellowships (to M. C. and E. S.). This work was also supported through the LabEx DISTALZ (Excellent Laboratory-Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's Disease), the CNRS Large Scale Facility NMR THC Fr3050, INSERM, CNRS, University of Lille 2, Lille Métropole Communauté Urbaine (LMCU), Région Nord/Pas-de-Calais, FEDER, the University of Antwerp Research Fund, the Alzheimer Research Foundation (SAO-FRA), the central Biobank facility of the Institute Born-Bunge/University Antwerp, the Belgian Science Policy Office Interuniversity Attraction Poles (IAP) program, and the Flemish Government initiated Methusalem excellence grant. J. W. and E. V. are both co-founders of ADx NeuroSciences and co-inventors on the patent entitled Antibodies to Phosphorylated Tau Aggregates (WO2013007839 (A1)).

This paper is dedicated to Skip Binder as a token of our appreciation for his generosity and his scientific legacy, which includes numerous and significant contributions to the Tau field.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: CODA-CERVA, Groenenlenberg 80, 1180 Brussels, Belgium.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 32-92-616984; Fax: 32-92-616981; E-mail: Eugeen.vanmechelen@adxneurosciences.com.

⁴ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 32-16-321516; Fax: 32-16-321967; E-mail: joris.winderickx@bio.kuleuven.be.

The microtubule-associated protein Tau is an “intrinsically disordered protein,” which undergoes posttranslational modifications like phosphorylation, glycosylation, truncation, oxidation, and acetylation (1–3). During Alzheimer disease (AD),⁵ a large pool of protein Tau becomes abnormally hyperphosphor-

⁵ The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; aa, amino acid(s); AP, alkaline phosphatase; CSF, cerebrospinal fluid; FAT, fast axonal transport; GAM, goat anti-mouse; MT, microtubule(s); MTBR, microtubule-binding repeat; NFT, neurofibrillary tangle(s); PAD, phosphatase-activating domain; PHF, paired helical filament(s); VAD, vascular dementia.

Novel Tau Monoclonal Antibodies

ylated, resulting in the loss of microtubule (MT) stabilization and the induction of conformational changes that allow the protein to oligomerize and aggregate into paired helical filaments (PHF) and neurofibrillary tangles (NFT) (4). The close correlation between the Tau pathology and the disease progression makes protein Tau a good biomarker for diagnosis. The protein is released from neurons into cerebrospinal fluid (CSF), and, indeed, several studies established that AD patients display CSF changes with elevated levels of total Tau and phosphorylated Tau, next to decreased levels of the amyloid β 42 peptide. Hence, the quantification of these parameters proved to be accurate for early diagnosis of AD (5, 6).

Data obtained from conditional Tau expression in transgenic mice point toward oligomeric Tau intermediates as toxic species and effectors in the etiology of AD (7). As such, recently developed oligomer-specific antibodies, like T22 (8) or TOC1 (9, 10), have been shown to preferentially label neurons at early stages of AD before the formation of NFT. Moreover, these antibodies also improved the discrimination between AD and control patients using total brain extracts, indicating their potential use as a pathophysiological biomarker (8–10). Most recent studies demonstrated that oligomers detecting antibodies can block Tau seeding activity and the propagation of Tau pathology in brains of transgenic mice when administered intracerebroventricularly, indicative that such antibodies have promising therapeutic potential (11, 12).

During the last decade, we and others reported on the use of *Saccharomyces cerevisiae*, or baker's yeast, as a valuable model organism to study protein aggregation disorders, such as Huntington and Parkinson diseases as well as AD (13). For the latter, this included not only toxicity models for the amyloid β peptides (14, 15) but also models based on expression of human wild-type Tau or its clinical mutants (16–19). These so-called humanized yeast models recapitulated robustly different important aspects of the Tau pathobiology associated with AD pathology, including Tau hyperphosphorylation, conformational change, and Tau self-aggregation (18, 19). Given the ease of genetic amenability of yeast, it was possible to modify major pathogenic phosphoepitopes on Tau, like the AD2 (Ser(P)³⁹⁶/Ser(P)⁴⁰⁴) and PG5 (Ser(P)⁴⁰⁹) epitopes, simply by deletion of the genes encoding for the protein kinases Mds1 and Pho85, the yeast orthologues of the two most important mammalian Tau kinases (*i.e.* GSK3- β and Cdk5, respectively). Importantly, whereas the lack of Mds1 coincides with reduced Tau phosphorylation at typical GSK3- β phosphoepitopes, the deletion of Pho85 triggers Tau hyperphosphorylation due to the secondary activation of different protein kinases, including Mds1/GSK3- β (18). Moreover, also in yeast, the phosphorylation status of protein Tau correlates with its immunoreactivity to the conformation-specific monoclonal antibody (mAb) MC1 and the amount of Sarkosyl-insoluble Tau, whereas an inverse correlation is found between Tau phosphorylation and its ability to bind and stabilize MT *in vitro*. In addition, purification of phosphorylated protein Tau from the yeast Δ pho85 strain revealed spontaneous filament formation without the addition of anionic aggregation-inducing agents as well as the capacity of the hyperphosphorylated subfraction to drastically accelerate Tau aggregation *in vitro* (18). Notably, crude extracts and purified

Tau preparations from humanized yeast contained higher molecular weight species, which, based on their apparent molecular weight, were tentatively identified as dimers and higher order oligomers (17, 19).

In this study, we used the hyperphosphorylated protein Tau isolated from the Δ pho85 yeast strain to generate novel high affinity Tau mAbs. Their characterization and validation in different model systems and AD brains indicated that the mAbs stained tangle-like structures and neuritic plaques in brain sections and recognized either low order or higher order Tau oligomers and presumed prefibrillar structures besides different monomeric Tau isoforms in protein extracts from diseased brain. This revealed that Tau oligomerization occurs early in the disease process. Furthermore, the novel mAbs proved to be valuable diagnostic tools, allowing the discrimination of patients clinically diagnosed with AD or vascular dementia from control persons based on immunodetection of total Tau in CSF samples.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains, Culture Conditions, and Tau Purification—Yeast strains were obtained from the genome-wide yeast deletion collection and grown according to standard procedures on glucose-containing selective medium. Constructs and protocols for the expression of the longest human Tau isoform (Tau-2N/4R; 441 amino acids (aa)) were as described previously (17–19). The Y18E point mutation was introduced in Tau using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent, Diegem, Belgium) using the forward and reverse mutagenesis primers 5'-TCACGCTGGGACGGAGGGGTTGGGGG-ACA-3' and 5'-TGTCCCCAACCCCTCCGTCCCAGCG-TGA-3'. Native protein Tau-2N/4R was purified from the Δ pho85 yeast strain as reported earlier (18), concentrated using 50 kDa Centricon filters (Millipore, Overijse, Belgium), and dialyzed overnight against PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄, pH 7.0) at 4 °C. For immunizations, the purified Tau was activated with glutaraldehyde and coupled to keyhole limpet hemocyanin via a two-step enamine covalent coupling to generate keyhole limpet hemocyanin-coupled Tau. For the dephosphorylation studies, purified Tau extracted from the Δ pho85 strain was treated with shrimp alkaline phosphatase (AP) (Roche Applied Science) according to the manufacturer's recommendations (17, 18).

Immunizations and Hybridoma Generation—After determination of the base titer via a preimmune tail bleeding, eight BALB/c mice were immunized with 5 μ g of keyhole limpet hemocyanin-coupled Tau to start the immune response, followed by a monthly check-up and four booster immunizations using 5 μ g of purified Tau in complete Freund's adjuvant, incomplete Freund's adjuvant (Lonza, Verviers, Belgium), and PBS, respectively. Titers were determined after the incomplete Freund's adjuvant immunization via tail bleeding. The spleen of the mouse with the highest titer was removed, washed in PBS + 0.5% BSA + 2.5 mM EDTA, and dissociated using the Gentle MACS dissociator T4171 until single cells were obtained. Cells were collected by centrifugation at 1000 rpm (228 \times g) for 10 min at room temperature, and resuspended in ammonium/chloride/potassium lysis buffer (Lonza) for 5 min at room tem-

TABLE 1

Synthetic peptides used for epitope mapping and phosphodependence studies

Specificity	Sequence
Tyr ¹⁸	MAEPRQEFVEMDHAGTYGLGDRK
Tyr(P) ¹⁸	MAEPRQEFVEMDHAGT ^p YGLGDRK
Y18E	MAEPRQEFVEMDHAGTEGLGDRK
Y18F	MAEPRQEFVEMDHAGTFGLGDRK
Thr ²¹⁷ /Tyr ¹⁸	GSRSRTPSLPPTPTREP ^k KVAGEFEVEMDHAGTYGLGDRK
Thr(P) ²¹⁷ /Tyr ¹⁸	GSRSRTPSLP ^p TPTREP ^k KVAGEFEVEMDHAGTYGLGDRK

perature in order to remove red blood cells. Hemolysis was stopped by adding PBS + 0.5% BSA + 2.5 mM EDTA. The remaining cells were collected by centrifugation at 1000 rpm (228 × g) for 10 min at room temperature and resuspended in PBS. Spleen cells were added to SP2/0 myeloma cells in a 1:1 ratio. The cell mixture was collected by centrifugation at 1000 rpm (228 × g) for 5 min at 4 °C. Cell fusion was performed using the HVJ viral fusion kit as described previously (20). The resulting cells were sown out over 36 96-well plates and selected using hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium.

Antibody Screening—Antibodies were selected using a sandwich ELISA setup using purified Tau-2N/4R from yeast or bacterial recombinant Tau as coated antigen (0.1 μg/ml). Detection was performed using goat anti-mouse coupled to horseradish peroxidase (GAM-HRP; 0.05 μg/ml) (Jackson, Suffolk, UK), urea hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich, Diegem, Belgium), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (VWR, Haasrode, Belgium). Plate reading was done in a BioTek SL800 spectrophotometer (BioTek, Pottom, UK) at 450 nm.

Biotinylation of Monoclonal Antibodies—For biotinylation, the antibodies were dialyzed overnight at 4 °C to boric acid buffer (113 mM, pH 8.6) in Slide-a-Lyzer cassettes with a molecular mass cut-off of 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgium). After dialysis, all antibodies were diluted to a concentration of 0.5 mg/ml. Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce Thermo Fisher, Erembodegem, Belgium) was added to the antibodies at 32:1, 64:1, and 128:1 biotin/antibody ratios and incubated for 1 h, shaking (400 rpm) at room temperature. The reaction was stopped using an equal volume of 1 M glycine and again incubated for 1 h, shaking (400 rpm) at room temperature. The biotinylated antibodies were then dialyzed to PBS overnight at 4 °C.

ELISA on Biopeptides—For ELISA using biopeptides (Proteogenix, Strasbourg, France), Nunc 96-well plates (VWR, Haasrode, Belgium) were coated with streptavidin (Roche, Vilvorde, Belgium) at a concentration of 5 μg/ml overnight at 4 °C. The plates were subsequently blocked with a PBS + 0.5% casein buffer solution. Biotinylated peptides were loaded onto the coated plates with a starting concentration of 100,000 pg/ml in PBS followed by a serial dilution of 1:4. The plate was incubated at 37 °C for 1 h. The wells were washed four times for 1 min with PBS + 0.05% Tween 20. The assay was then incubated with biotinylated antibodies ADx215 and ADx201 (0.125 μg/ml in PBS + 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Detection was performed using GAM-HRP, urea hydrogen peroxide and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. The plates were scanned using a BioTek SL800 spectrophotometer (BioTek) at 450 nm (and 630 nm for background). The peptide sequences are given in Tables 1 and 2.

TABLE 2

Peptide scanning results for ADx215 epitope determination

Start	Stop	Sequence	milli- <i>A</i> _{450 nm}
6	20	QEFVEMDHAGTYGL	50
7	21	EFEVEMDHAGTYGLG	97
8	22	FEVEMDHAGTYGLGD	141
9	23	EVEMDHAGTYGLGDR	911
10	24	VMEDHAGTYGLGDRK	2055
11	25	MEDHAGTYGLGDRKD	2161
12	26	EDHAGTYGLGDRKDQ	2100
13	27	DHAGTYGLGDRKDQG	2082
14	28	HAGTYGLGDRKDQGG	2387
15	29	AGTYGLGDRKDQGGY	2434
16	30	GTYGLGDRKDQGGYT	2229
17	31	TYGLGDRKDQGGYTM	1364
18	32	YGLGDRKDQGGYTMH	171
19	33	GLGDRKDQGGYTMHQ	60
20	34	LGRDKDQGGYTMHQD	49
21	35	GDRKDQGGYTMHQDQ	49

NMR-based Epitope Mapping—¹⁵N-Labeled Tau-2N/4R was prepared as described previously (21). The protein was prepared without His tag; thus, purification after an initial heating step of the bacterial extract at 75 °C for 15 min involved one further step of cation exchange chromatography (using an SPFF column; GE Healthcare). The sampling was desalted on a G25 Superdex column in a 50 mM ammonium bicarbonate buffer before estimation of the concentration by absorbance at 280 nm and subsequent lyophilization of 1-mg aliquots. A sample of 30 μM Tau-2N/4R in 200 μl of buffer (100 mM phosphate, pH 6.6, 75 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% D₂O) was the reference, and equivalent samples of Tau-2N/4R with 30 μM ADx215 or ADx201 were prepared. The ¹H,¹⁵N heteronuclear single-quantum correlation NMR spectrum was recorded on a 900-MHz Bruker Avance III spectrometer equipped with a cryogenic triple resonance probe head. The spectra were acquired with 4096 × 512 complex points in *T*₂, *T*₁ with 16 scans/increment. Total time for an experiment was 2 h 50 min. Spectra were zero-filled and transformed after multiplication with a squared sine bell apodization function. Signal intensities were determined with Bruker Topspin version 3.1 software.

Determination of the Antibody Affinity—A BIAcore 3000 instrument (GE Healthcare) was used at 25 °C with a BIAcore CM5 sensor mounted into the system. The sensor was preconditioned by a 1-min injection at 100 μl/min of 0.1% SDS, 50 mM NaOH, 10 mM HCl, and 100 mM H₃PO₄. As a running buffer, HBS-EP buffer was used (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% (w/v) P20). The sample buffer was the system buffer supplemented with 1 mg/ml carboxymethyl dextran (Sigma). An antibody capture system was established on the sensor surface. 6500 relative units of Fcγ-fragment rabbit anti-mouse IgG (GE Healthcare) were immobilized according to the manufacturer's instructions using EDC/NHS chemistry on all four flow cells. The sensor was deactivated using 1 M ethanolamine. Antibodies were captured at 35 nM concentration by a 1-min injection at 10 μl/min on the flow cells 2 and 3. Flow cell 1 served as a reference. The flow rate was set to 100 μl/min, and the 45-kDa Tau analyte in solution was injected for 2 min. The dissociation was monitored for 5 min. Analytes in solution were injected for 2 min in a concentration series of 0, 3, 11, 2 × 33, 90, and 180 nM. The dissociation was monitored for 5 min. The sensor was regenerated by three consecutive injections of 10

TABLE 3
Antibodies used in these studies

Antibody	Specificity	Source
Primary Abs		
Actin (AC-18)	β -Actin	Sigma-Aldrich (Diegem, Belgium)
9G3/P-Tyr18	Tau; Tyr(P) ¹⁸	Medimabs (Montréal, Canada)
12E8	Tau; Ser(P) ²⁶² /Ser(P) ³⁵⁶	Elan Pharmaceuticals (San Francisco, CA)
AD2	Tau; Ser(P) ³⁹⁶ /Ser(P) ⁴⁰⁴	Sigma-Aldrich
AT8	Tau; Ser(P) ²⁰² /Thr(P) ²⁰⁵	Innogenetics (Ghent, Belgium)
AT180	Tau; Thr(P) ²³¹	Innogenetics
AT270	Tau; Thr(P) ¹⁸¹	Innogenetics
P-S396	Ser(P) ³⁹⁶	Merck-Millipore (Overijse, Belgium)
BT2	Tau; aa 193–198	Innogenetics
HT7	Tau; aa 159–163	Innogenetics
M19G	Tau; aa 1–19	A. Delacourte (34)
MC1	Tau; aa 5–15/312–322; conformation-dependent	Generous gift from P. Davies (59)
TauCter	Tau; aa 426–441	A. Delacourte (34)
TAU1	Tau; Ser ¹⁹⁸ /Ser ¹⁹⁹ /Ser ²⁰²	Chemicon (Temecula, CA)
TAU5	Tau; aa 218–225	BD Pharmingen (San Diego, CA)
TOC1	Tau; aa 155–244/376–421; oligomer-specific	Generous gift from L. Binder (9)
ADx201	Tau; aa 218–224	Generated in this study
ADx201-bio	Tau; aa 218–224	Generated in this study
ADx215	Tau; aa 16–24	Generated in this study
ADx215-bio	Tau; aa 16–24	Generated in this study
ADx210	Tau; conformational epitope	Generated in this study
ADx210-bio	Tau; conformational epitope	Generated in this study
Secondary Abs		
GAM-HRP	Anti-mouse mAb	Thermo Fisher Scientific (Erembodegem, Belgium)
GAM-Alexa594	Anti-mouse mAb	Abcam (Cambridge, UK)
RAM ^a -HRP	Anti-mouse mAb	Thermo Fisher Scientific

^a Rabbit anti-mouse.

mM glycine buffer, pH 1.7, for 1 min at 100 μ l/min. ADx201 showed a biphasic binding behavior for Tau-2N/4R. A four-parameter sigmoidal model (22) was used to describe an apparent affinity. ADx215 showed a single exponential sensorgram curvature and was evaluated according to a Langmuir fit. Because ADx215 showed a too high complex stability beyond the instrument limits of resolution, the dissociation rate, K_d , was set to 1.0E–05/s.

Immunoblotting and Immunohistochemistry—Samples for immunoblotting were prepared and processed as described previously (18, 23). Bacterial recombinant His-tagged human Tau-2N/4R (Merck Millipore (Nottingham, UK) and rPeptide (Bogart, GA)) was used as standard in the initial yeast-based assays. All antibodies used for detection of Tau or reference proteins are listed in Table 3. Dephosphorylation of Tau in yeast extracts was performed using alkaline phosphatase as described previously (17). For immunohistochemistry, we used free floating coronal sections of 40 μ m for THY-Tau22 transgenic mice (23) and human hippocampal sections and paraffin-embedded sections of 7 μ m in the case of human cortex. Human brain samples were obtained from the brain bank of University Hospital in Lille (Table 4). Protocols for tissue treatment, the preparation of the sections, and the immunostainings were described previously (23, 24). The phospho-dependent Tau antibody AT8 (Ser(P)²⁰²/Thr(P)²⁰⁵ Tau) (Pierce) served as a reference antibody for immunohistochemistry.

In Situ Immunodetection in Yeast Cells—Exponentially growing *pho85* Δ yeast cells expressing human Tau 2N/4R were fixed by adding formaldehyde at a final concentration of 4% and incubated for 15 min at room temperature. Cells were then collected and suspended in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5. Formaldehyde was added a second time to a final concentration of 4%. The suspension was incubated at 30 °C for 2 h. Cells were then washed in phosphate buffer and then in PBSorb (phos-

TABLE 4
Human samples used for validation of the mAbs

Code	Age	Sex	PMI ^a	Pathology	Braak stage
	<i>years</i>		<i>h</i>		
C49	49	Male	34	None	
C52	52	Female	28	None	
C53	53	Male	28	None	
C61	61	Male	20	None	
C75	75	Male	7	None	
AD84	84	Male	18	AD	4
AD91	91	Female	18	AD	4
AD62	62	Male	10	AD	5
AD73	73	Male	15	AD	5
AD76	76	Female	3	AD	5
AD77	77	Male	6	AD	5
AD57	57	Male	23	AD	6
AD59	59	Female	26	AD	6
AD72	72	Female	5.5	AD	6
AD73B	73	Female	22	AD	6
AD74	74	Male	4	AD	6
AD76B	76	Male	7	AD	6
AD86	86	Female	10	AD	6
AD86B	86	Male	10	AD	6

^a Post-mortem interval.

phate buffer containing 1.2 M sorbitol). For spheroplasting, cells were immersed in PBSorb containing β -mercaptoethanol and lyticase (Sigma-Aldrich), incubated for 40 min at 30 °C, and then collected by centrifugation at low speed (200 \times g). Next, spheroplasts were added onto a polylysine slide (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) and incubated for 10 min at room temperature in a humidified chamber. The liquid was then drained, and the slides were left to dry. The samples were subsequently submerged in methanol and acetone (each for 6 min 30 s at –20 °C) and blocked with PBSB (phosphate buffer containing BSA at 10 mg/ml) for 30 min. After washing, solutions of PBSB containing antibodies TAU5, TOC1, and MC1 at a concentration of 1:200 were added, and the slides were incubated overnight at 4 °C. The day after, the samples were washed

TABLE 5

Summary of the demographic, clinical, and biomarker data of the population used for CSF-based ELISA

	AD	VAD	Control
<i>n</i> (female/male)	20 (7/13)	20 (11/9)	20 (11/9)
Average age (years) (range)	81 (62–97)	77 (56–87)	48 (25–85)
MMSE ^a score (range)	13.5 (4–27)	15 (0–26)	NA ^b
Age at onset (years) (range)	79 (60–95)	75 (56–85)	NA
Disease duration (years) (range)	2 (1–7)	2 (0–9)	NA
Median CSF-Tau (pg/ml) (quartiles) ^c	596 (457–881)***	391 (305–629)*	271 (178–355)

^a Minimal mental state examination (score of 30).^b NA, not available.^c CSF-Tau data are presented as median values with 25th and 75th quartiles because these data are not normally distributed. A Kruskal-Wallis test was used to compare groups separately. *, $p < 0.05$ versus control; ***, $p < 0.001$ versus control.

with PBSB and dried at room temperature in the dark. Finally, a solution of PBSB containing the secondary antibody GAM-Alexa594 (Molecular Probes, Inc., concentration 1:200) was added, and the slides were incubated for an additional 2 h in the dark. In the last step, samples were washed, and mounting medium was added. At any critical step, quality of the spheroplast was checked by microscopy. Analysis was performed with a fluorescence microscope (model DFC420C, Leica).

CSF Samples and ELISA Detection Total Tau—Cerebrospinal fluid (CSF) from patients recruited in the Memory Clinic and the Department of Neurology of Hospital Network Antwerp (ZNA) were selected from the Biobank of the Institute Born-Bunge (Antwerp, Belgium). Patients with AD ($n = 20$), vascular dementia (VAD; $n = 20$), and controls ($n = 20$) were included (Table 5). Patients with dementia due to AD were diagnosed according to the NIA-Alzheimer's Association criteria (25). VAD was diagnosed according to the NINDS-AIREN criteria (26). The inclusion criteria for the control group were: 1) no neurological or psychiatric antecedents and 2) no organic disease involving the central nervous system following extensive clinical examination. The study was approved by the local ethics committee. CSF was obtained by lumbar puncture (lateral posterior nucleus of the thalamus) at the L3/L4 or L4/L5 interspace. CSF samples were collected in polypropylene vials (Nalgene® catalog no. 5000-1020), immediately frozen in liquid nitrogen, and subsequently stored at -80°C until analysis.

For the CSF total Tau ELISA assay we used a peptide comparable with the peptide Thr²¹⁷/Tyr¹⁸ (Table 1) as calibrator and mixed 25 μl of CSF sample or calibrator with 100 μl of sample diluent (0.1% casein in PBS, 0.2% Triton X-705 (Sigma T70570)) containing the biotinylated detector antibody, ADx215bio. ADx201 was coated as a capture antibody on the plate. Plates were washed five times with 400 μl /well wash buffer (0.05% Tween (Merck S6299684) in PBS) after the 3-h sample incubation at room temperature. Detection of the biotinylated antibody was done with a ready-to-use streptavidine-peroxidase complex (SA-PolyHRP80, SDT GmbH SP80C), and after another five washes, color development was done at room temperature for 30 min. The enzymatic reaction was stopped with 100 μl of stop solution (0.5 N H₂SO₄), and optical density was measured at 450 and 630 nm for background. Conversion of OD values to pg/ml was done using a four-parameter logistic curve fitting using the values assigned to the calibrator.

Lipid Raft Isolation—The procedure for lipid raft isolation has been described previously (27). Briefly, cortex homogenates were prepared in TBS containing 1% Triton X-100, phosphatase inhibitors (1 mM Na₃VO₄, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ okadaic acid), and a

protease inhibitor mix (Roche Applied Science) and then incubated on ice for 30 min. The homogenates were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min, and supernatants were collected. The total protein concentrations were then determined by using the BCA protein assay kit (Pierce). A total amount of 1 mg of protein extract was taken for fractionation and mixed with a sucrose solution to reach 40% concentration (m/v) and then overlaid with 6 ml of 30% sucrose (m/v) and subsequently with 1.3 ml of 5% sucrose (m/v). The samples were centrifuged at $100,000 \times g$ for 18 h at 4°C in SW60 rotor (Beckman Coulter, Brea, CA). Eight equal fractions were taken, and every fraction was precipitated by adding 100% trichloroacetic acid. Samples were centrifuged and protein pellets were suspended in $2 \times$ SDS-PAGE buffer. Equal volumes of particular fractions were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.

RESULTS

Generation and Characterization of the Novel mAbs—The expression of human Tau (longest isoform, 2N/4R; 441 aa) in yeast has been characterized extensively before, thereby showing robust traits found in AD (17–19). In this study, we focused mainly on expression of Tau in the *pho85* Δ strain, which lacks the yeast orthologue of Cdk5 and displays extensive hyperphosphorylation of protein Tau and higher levels of Sarkosyl-insoluble Tau as compared with the BY4741 wild type strain (18). Using *in situ* immunodetection with the pan-antibody TAU5, we now show that human Tau is not evenly distributed throughout the cytoplasm in *pho85* Δ cells as the protein forms diffuse foci. With the mAbs MC1 and TOC1, we confirm that also in yeast protein, Tau does adopt an aggregation-prone conformation and forms prefibrillar oligomers (Fig. 1A). For the generation of novel mAbs, human Tau was purified from the *pho85* strain using anion exchange chromatography.

After ELISA-based selection of the hybridomas, the newly generated Tau-mAbs were further characterized using different methods. As evidenced by SDS-PAGE and Western blot analysis of total protein extracts from the humanized BY4741 wild type yeast strain and the isogenic *mds1* and *pho85* deletion mutants (Fig. 1B), two of the mAbs (*i.e.* ADx201 and ADx215) recognized monomeric Tau phosphoisoforms in all yeast extracts and provided a banding pattern in the 65–75 kDa molecular mass region that was comparable with that obtained with TAU5, which was used as a control. Both antibodies also recognized non-phosphorylated bacterial recombinant His-tagged human Tau. Interestingly, ADx215 reacted as well to Tau oligomers found at 100 kDa and above (Fig. 1B). These oligomers were observed at similar levels in extracts of the wild

Novel Tau Monoclonal Antibodies

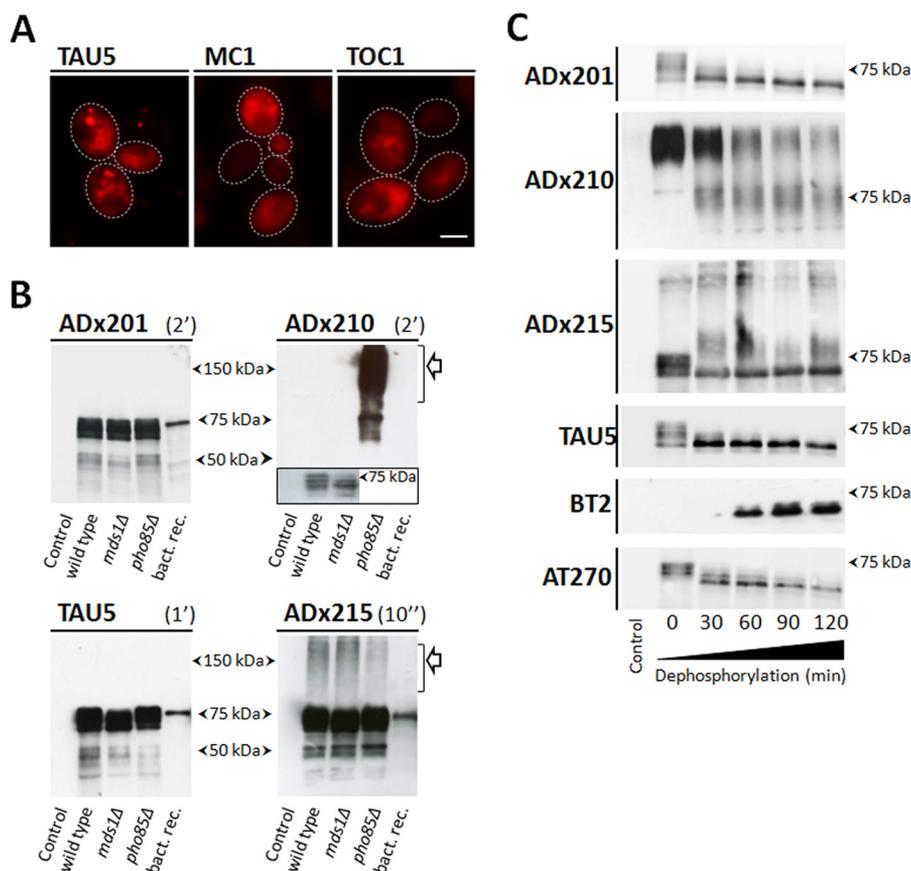


FIGURE 1. *In situ* immunodetection of Tau and characterization of novel monoclonal antibodies in yeast. *A*, *in situ* immunodetection of total Tau (TAU5), the pathogenic Tau conformation (MC1), and oligomeric Tau (TOC1) in spheroplasts of the BY4741 wild-type strain expressing human Tau-2N/4R. Scale bar, 2 μ m. *B*, Western blot analysis of protein extracts made from the BY4741 wild-type strain with the empty vector (lane 1), the BY4741 wild type strain expressing Tau-2N/4R (lane 2), the $\Delta mds1$ strain expressing 2N/4R Tau (lane 3), and the $\Delta pho85$ strain expressing human Tau-2N/4R (lane 4). TAU5 was used as a control antibody. Exposure times were 10 s for ADx215, 2 min for ADx201 and ADx210, and 1 min for TAU5. The open arrows indicate oligomeric Tau as detected by ADx210 and ADx215. The inset for ADx210 shows that this mAb also recognizes monomeric Tau at longer exposure times. *C*, Western blot analysis of AP-treated samples. Lane 1, extracts of the $\Delta pho85$ strain transformed with the empty vector. Lane 2, untreated extracts of the $\Delta pho85$ strain expressing Tau; lanes 3–6, the same extract but treated with SAP for 30, 60, 90, and 120 min, respectively.

type strain and the $\Delta mds1$ or $\Delta pho85$ kinase deletion mutants, indicative that their formation is not dependent on the hyperphosphorylation of Tau. Another mAb (*i.e.* ADx210) had weaker affinity for monomeric Tau isoforms in the extracts of wild type yeast and the $\Delta mds1$ mutant, where its detection required overexposure (Fig. 1*B*). In contrast, in the extract of the $\Delta pho85$ strain, ADx210 displayed strong reactivity toward monomeric hyperphosphorylated Tau as well as Tau oligomers, thereby suggesting that the formation of these oligomers would require Tau hyperphosphorylation. In line with this, ADx210 did not react to bacterial recombinant Tau, which is not phosphorylated.

To confirm differences in phosphorylation dependence of the generated mAbs, we treated the protein extracts of the $\Delta pho85$ strain with AP for different time intervals and again checked the immunoreactivity but with lower exposure times in order to be able to distinguish the different monomeric phosphoisoforms. As shown for ADx201 and ADx215 (Fig. 1*C*), the AP treatment resulted in the disappearance of the highest monomeric Tau phosphoisoforms, seen on Western blot at an approximate molecular mass around 75 kDa and in an increase of less phosphorylated isoforms running at lower molecular mass. Similar to the pan-Tau antibody TAU5, the overall

immunoreactivity of ADx201 or ADx215 remained equal in all samples examined. In contrast, an increased immunoreactivity was observed after prolonged AP treatment with the commercially available antibody BT2, specifically recognizing non-phosphorylated protein Tau (28), whereas a gradually decreased immunoreactivity was seen with the Thr¹⁸¹ phosphospecific antibody AT270 (29). Hence, these data suggest that ADx201 and ADx215 do not have phosphodependence.

Although AP treatment resulted in the appearance of intermediate bands running between 75 and 85 kDa, most of the Tau oligomers detected with ADx215 were resistant to AP treatment and persisted even after 2 h of treatment at 37 °C. In contrast, the Tau oligomers detected with ADx210 steadily diminished upon prolonged AP treatment, and, interestingly, this coincided with the appearance of monomeric Tau isoforms. The observation of a gradual decrease of ADx210-positive oligomeric Tau upon dephosphorylation corroborates a link between Tau phosphorylation and Tau self-assembly. Moreover, these data nicely illustrate that oligomers detected by ADx210 have different properties than those detected by ADx215. Note, however, that there is no inverse correlation with the disappearance of oligomers and the appearance of the monomeric forms, as detected by ADx210, whereas such cor-

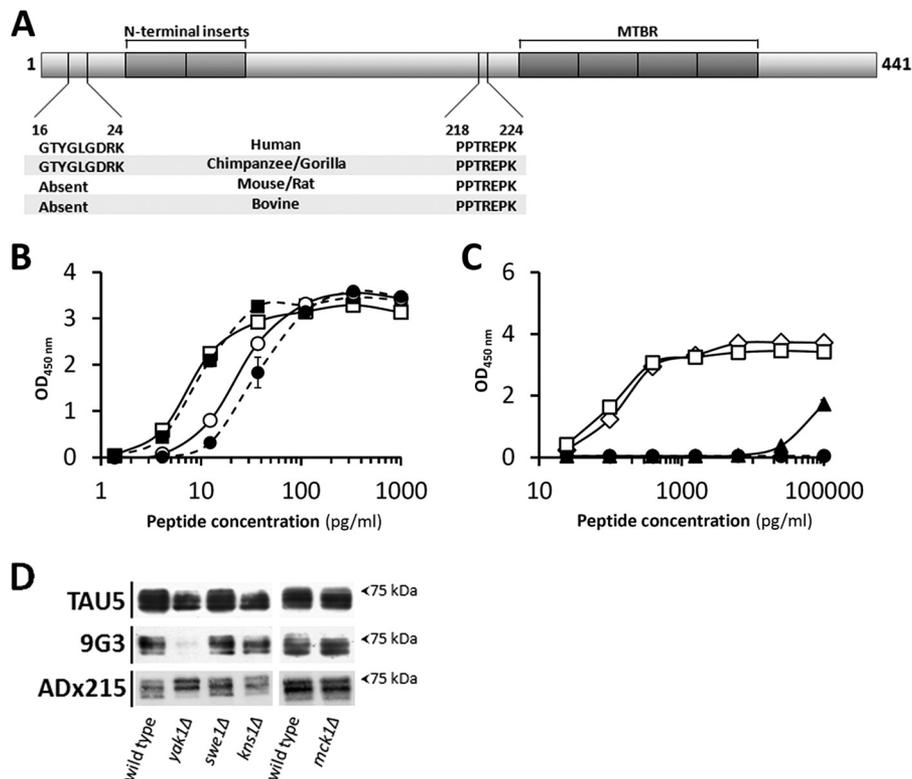


FIGURE 2. Epitope mapping and phosphorylation dependence. *A*, schematic representation of human Tau-2N/4R with the shaded regions corresponding to the two N-terminal inserts and the four MTBR as indicated. Shown are the epitope of ADx215 (aa 16–24), which is specific for primates, and the epitope of ADx201 (aa 218–224), which is found in different mammalian Tau sequences. *B* and *C*, ELISA using synthetic biotinylated peptides to analyze phosphorylation dependence of ADx201 and ADx215 binding. The peptides used in *B* combined the epitopes of ADx201 and ADx215 and differed by the presence (closed symbols) or absence (open symbols) of a phospho-Thr, corresponding to position 217 in human Tau-2N/4R. Circles, data for ADx201; squares, data for ADx215. The peptides used in *C* all contained the epitope for ADx215 but differed by the presence (closed triangles) or absence (open diamonds) of a phospho-Tyr¹⁸ or contained the substitution Tyr → Phe¹⁸ (open squares) or the phosphomimic substitution Tyr → Glu¹⁸ (closed circles). The sequences of the peptides are given in Table 1. *D*, Western blot analysis of protein extracts made from the BY4741 wild-type strain and mutant strains lacking the dual specificity kinase Yak1, Swe1, Kns1, or Mck1 as indicated. All strains express human Tau-2N/4R, of which various phosphoisoforms were detected with TAU5, 9G3, or ADx215. Error bars, S.E.

relation is found for the appearance of non-phospho-Tau based on staining with BT2. This suggests that monomeric Tau detected by ADx210 still has some degree of phosphorylation and thus that the ADx210 epitope may be destroyed upon further dephosphorylation. This could explain in part the lower affinity of ADx210 for Tau monomers.

Determination of the mAb Epitopes—Different strategies were applied to determine the epitopes of ADx201 and ADx215. First, for the phospho-independent mAbs, the use of recombinant Tau fragments, covering different regions of the Tau protein (30), allowed us to roughly position the epitope for ADx201 within the proline-rich region of Tau and that of ADx215 closer to the N terminus. Next, different sandwich ELISA formats were performed, whereby ADx201 and ADx215 competed with previously characterized commercial and non-commercial antibodies for binding of the recombinant protein Tau fragments. This approach successfully determined the approximate epitope for ADx201 because it turned out that the AT120 antibody (30) inhibited ADx201 reactivity. This was confirmed by using synthetic biotinylated peptides that contained the epitope ²¹⁸PPTREPK²²⁴ (Fig. 2A and Table 1). In contrast to ADx201, no significant competition was found when ADx215 was used in the sandwich ELISA assays, indicative that this mAb recognized a novel epitope. Therefore, the epitope was mapped by scanning the N terminus of Tau using a series of

small overlapping peptides (Table 2). This approach eventually narrowed the binding site of ADx215 to ¹⁶GTYGLGDRK²⁴ (Fig. 2A), an epitope that is specific for primates and not present in Tau of bovine or rodents.

The ADx201 epitope is just adjacent to the Thr²¹⁷ residue, a known phosphosite of Tau associated with AD that is targeted by different kinases (4). To test whether the phosphorylation of Thr²¹⁷ influences the binding of ADx201, we performed an ELISA using synthesized peptides, one of which contained the phosphorylated Thr²¹⁷ (Table 1). As shown, phosphorylation of the latter had only a minimal effect on ADx201 binding (Fig. 2B), thereby confirming the results obtained with Tau dephosphorylation. Because the peptides used also contained the ADx215 epitope, the relative affinities of both mAbs could be compared. As expected, the affinity of ADx215 was better than that of ADx201 with EC₅₀ values for the non-phosphorylated peptide of 7.99 ± 1.79 and 23.26 ± 2.58 pg/ml, respectively. To document this in more detail, the apparent K_D values were also calculated based on Biacore biomolecular interaction assays using full-length recombinant bacterial Tau-2N/4R. This revealed apparent K_D values of 92 pM for ADx201 and 14 pM for ADx215.

In another ELISA, we tested the phosphorylation dependence of ADx215 using peptides modified on Tyr¹⁸ (Table 1). This residue is a known phosphosite targeted by the Src non-

Novel Tau Monoclonal Antibodies

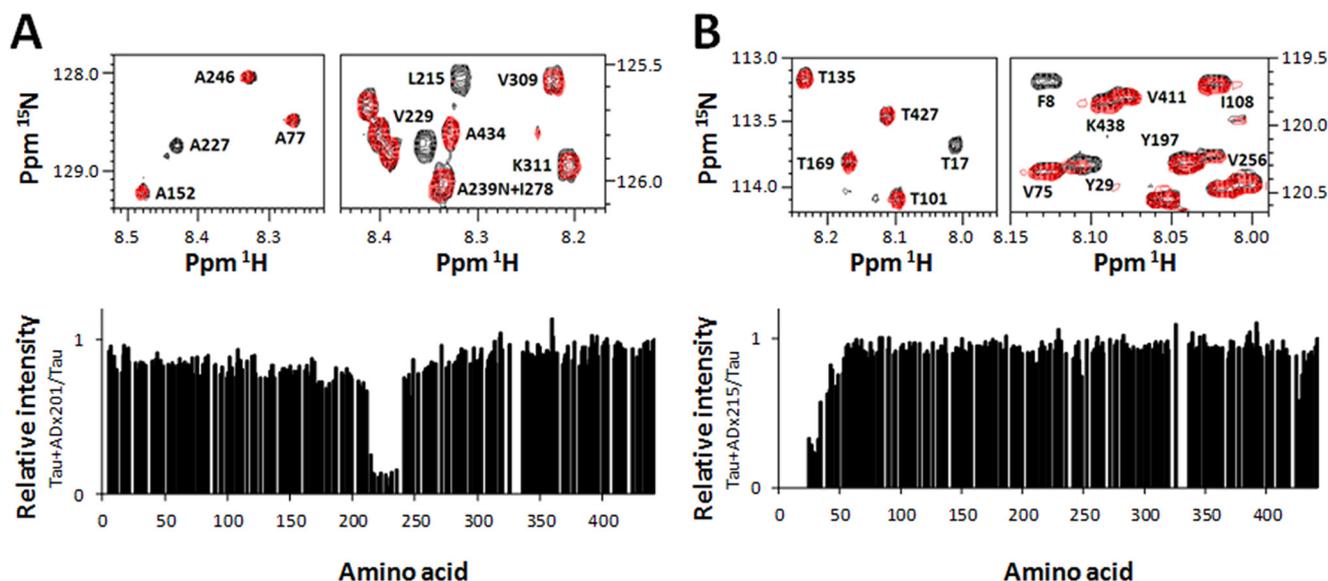


FIGURE 3. Confirmation of the ADx215 and ADx201 epitopes by NMR spectroscopy. NMR analysis of the ADx201 (A) and ADx215 (B) epitopes is shown. The ^1H , ^{15}N heteronuclear single-quantum correlation NMR spectra at 900 MHz of a 1:1 Tau antigen to antibody sample (red) and a pure antigen sample (black) were recorded. Some relevant regions of the spectra showing peak disappearance are depicted at the top. The ratio of the relative intensities per amino acid is shown at the bottom. A ratio close to zero indicates that this particular amino acid is in the potential epitope of the antibody.

receptor tyrosine kinase family member Fyn that increases during disease progression (31). However, consistent with the Tau dephosphorylation data, ADx215 shows a preference for non-phosphorylated Tyr¹⁸ (Fig. 2C). Furthermore, in contrast to a peptide containing a Tyr → Phe¹⁸ substitution, ADx215 did not recognize a peptide containing a Tyr → Glu¹⁸ substitution or the equivalent full-length phosphomimic Tyr → Glu¹⁸ Tau protein when this was expressed in yeast (Fig. 2C) (data not shown). In this context, it is interesting to note that whereas the yeast genome does not encode for *bona fide* tyrosine kinases, comparative Western blot analysis with the phospho-Tyr¹⁸ antibody 9G3 (31) revealed Tyr¹⁸ to be targeted by the dual specificity kinase Yak1, the yeast orthologue of human Dyrk1 (Fig. 2D). Consistently, immunodetection with ADx215 yielded different Tau phosphoisoform profiles in wild type cells and cells lacking Yak1.

We could not use competitive sandwich ELISA or peptide scanning to determine the exact epitope of ADx210 because this mAb has a higher affinity for oligomeric Tau than for monomeric Tau and thus apparently recognizes a non-linear epitope. Nonetheless, some of the data described below suggest that the ADx210 epitope most likely includes exposed sequences of the proline-rich region.

Finally, we used a recently developed NMR assay to directly map the epitope on full-length Tau (32). Hereby, the ^1H , ^{15}N heteronuclear single-quantum correlation spectrum of Tau-2N/4R when isolated in solution is compared with its spectrum when in a 1:1 complex with the antibody. Immobilization of the epitope at the surface of the large antibody thereby changes the NMR properties of the amide functions involved, leading to line broadening and concomitant disappearance of the epitope from the spectrum. For the ADx201 epitope, the relative intensity profile shows a pronounced intensity dip between Ser²¹⁴ and Ser²³⁵ (Fig. 3A), whereas the addition of the ADx215 antibody causes signal disappearance in the very N-terminal part of

the protein, with detectable intensity only starting from Asp²⁵ (Fig. 3B). We cannot exclude the possibility that a couple of residues have their signal broadened because of the steric hindrance due to the antibody surface. Nonetheless, the NMR results confirm in a direct manner the epitopes obtained from the previous experiments.

Validation of the mAbs in Samples of Transgenic Rodents and AD Brains—To further validate the generated mAbs in the mammalian brain, we performed immunoblotting using hippocampal homogenates from 3-month-old wild type mice and 3- or 12-month-old THY-Tau22 transgenic mice (Fig. 4) that showed, respectively, weak and severe Tau pathology (23). ADx201 and ADx210 recognized a 55-kDa endogenous mouse Tau isoform in samples of non-transgenic mice. ADx215 failed to detect this isoform, which is consistent with the finding that this mAb recognized a primate-specific epitope. In protein extracts of the THY-Tau22 mice, all mAbs reacted well to monomeric human Tau isoforms running at ~60–62 kDa as well as some breakdown products. In addition, ADx215 easily detected Tau oligomers with an approximate mass of 115 kDa, which may correspond to Tau dimers. ADx215 also recognized a number of discrete intermediate bands around 75 and 85 kDa. These oligomers and intermediate bands were hardly recognized by ADx201 and ADx210. Although there was a slight decrease in the overall intensity of ADx215-positive oligomers and monomeric Tau isoform as the transgenic mice grew older, their ratio did not appear to change significantly with increasing age. This is interesting because previous characterization of the THY-Tau22 transgenic mice clearly documented Tau hyperphosphorylation increasing dramatically with age (23). Hence, it appears that these ADx215-positive oligomers may be formed prior to severe Tau hyperphosphorylation and thus that there is no strict correlation between Tau hyperphosphorylation and the formation of these low order oligomers.

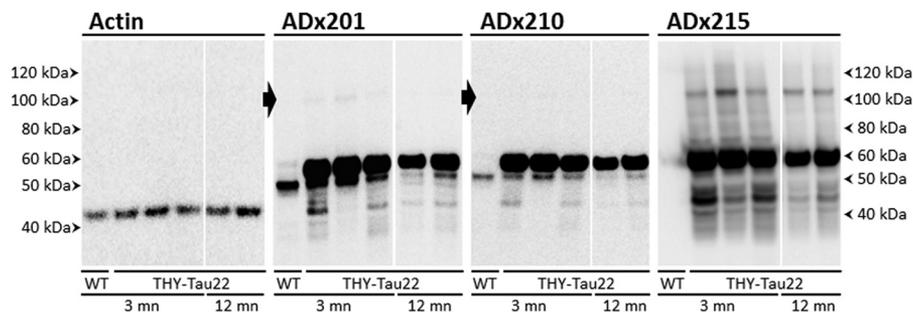


FIGURE 4. **Biochemical validation in brain of transgenic rodents.** Western blot analysis is shown of hippocampal brain extracts obtained from wild type control mice (*WT*) or the transgenic THY-Tau22 mouse model at the age of 3 or 12 months (*mn*) using the mAb ADx201, ADx210, or ADx215. The *closed arrows beside* the pictures obtained with ADx201 or ADx210 mark the position where Tau oligomers are faintly detected in the THY-Tau22 samples. The filter probed with ADx201 was stripped and used to detect actin, which served as loading control.

Next, we analyzed homogenates of the frontal and parietal cortex obtained from post-mortem biopsies of healthy persons and AD patients at Braak stages 4, 5, and 6 (Table 4). Besides recognizing various monomeric Tau isoforms in the different samples tested, the three mAbs stained Tau oligomers specifically in the homogenates of AD diseased brains (Fig. 5, *A* and *B*). Indeed, ADx215 recognized mainly low order Tau oligomers of about 130 kDa and lower intermediate bands. ADx201 and ADx210, on the other hand, displayed a quite different pattern because they had the capacity to visualize additional folding intermediates, higher order oligomers, and presumed prefibrillary structures of Tau. Notably, Tau oligomers were already present at Braak stage 4 (Fig. 5*B*), suggesting that they mark an earlier stage in AD pathology. This corroborates previously reported data (8, 9).

Tau Dimers Are Phosphorylated in the N-terminal Half—Our data on analysis of transgenic mice and human brain samples suggested that the formation of oligomers may precede severe Tau hyperphosphorylation, meaning that oligomerization would already start when Tau is aberrantly phosphorylated at only a few specific sites and that further hyperphosphorylation of Tau would subsequently drive low order oligomers to grow into higher order oligomeric structures. To test this scenario in more detail, we performed Western blot analysis with frontal cortex homogenates prepared from healthy brain and AD patient brain at Braak stage 5. We used different antibodies to determine which of those would preferentially detect the 130-kDa oligomers or the higher order oligomers. As shown in Fig. 6*A*, TAU1, a mAb specific for dephosphorylated Tau in the region between amino acids 189 and 207, failed to detect Tau oligomers, indicative that oligomers are indeed phosphorylated in this region. In contrast, the mAb HT7, which recognizes an epitope formed by the amino acids 159–163 independently of the phosphorylation status, readily visualized 130-kDa oligomers in the AD brain sample and thereby displayed a profile similar to that obtained by ADx215. Also, AT180 and 12E8 clearly visualized these 130-kDa oligomers in the AD sample, and because these mAbs recognize the phosphoepitopes Ser(P)²³¹/Thr(P)²³⁵ and Ser(P)²⁶²/Ser(P)³⁵⁶, respectively, this observation confirms that the 130-kDa oligomers contain phosphorylated Tau. As mentioned above, ADx215 shows a preference for non-phosphorylated Tyr¹⁸; therefore, we also included immunodetection with the phospho-Tyr¹⁸-specific mAb 9G3. As shown, 9G3 reasonably stained Tau monomeric

isoforms and oligomers of an approximate molecular mass of 100 and 150 kDa in both the healthy and AD brain sample, but it did not stain the 130-kDa oligomers. When using mAbs that recognize phosphoepitopes C-terminal of the microtubule-binding repeat (MTBR) region, such as AD2 (Ser(P)³⁹⁶/Ser(P)⁴⁰⁴; Fig. 6*A*) or P-S396 (Ser(P)³⁹⁶; Fig. 6*B*), a completely different pattern was obtained. This pattern more closely resembles that obtained with ADx201/ADx210 (see Fig. 5, *A* and *B*) and is characterized by the detection of additional folding intermediates and higher order oligomeric structures in the AD sample. Note that, similar to 9G3, AD2 also recognized oligomers of ~100 and 150 kDa in the healthy control sample. Combined, these data suggest that the ADx215-positive 130-kDa oligomers are typified by exposure of different phosphoepitopes N-terminal of and in the MTBR region, whereas the higher order oligomeric structures additionally expose phosphoepitopes in the Tau C terminus.

To evaluate whether differences in Tau C-terminal phosphorylation may explain, at least in part, why we were unable to detect higher order Tau oligomeric structures in the mice samples (Fig. 4), as opposed to the human AD samples (Fig. 5, *A* and *B*), we compared the degree of Ser³⁹⁶ Tau phosphorylation in cortex homogenates of a healthy person, an AD patient at Braak stage 5, and a THY-Tau22 transgenic mouse sacrificed at 12 months of age. As shown, P-S396 reacted very strongly with Tau monomers and higher order Tau oligomeric structures in the sample of the AD patient but only faintly detected Tau monomers and no oligomers in the sample of the transgenic mice, this despite the fact that the levels of the Tau monomers in the mouse sample were significantly higher, as evidenced by immunodetection with ADx201 (Fig. 6*B*). The latter was expected because the THY-Tau22 mice expresses 10 copies of the human Tau transgene (23). Thus, in comparison with human AD brain, Tau is significantly less phosphorylated in its C terminus in the brain of the THY-Tau22 transgenic mice.

Finally, because Tau oligomers are suspected to have an important role in disease propagation (11) and because previous studies indicated that phosphorylated Tau accumulated in detergent-resistant membrane domains or lipid rafts during disease progression (33), we evaluated whether the 130-kDa oligomers would preferentially interact with these lipid domains. To this end, we separated the insoluble membranes of AD frontal cortex homogenates at Braak stage 6 and performed fractionations by flotation on a sucrose gradient. Besides

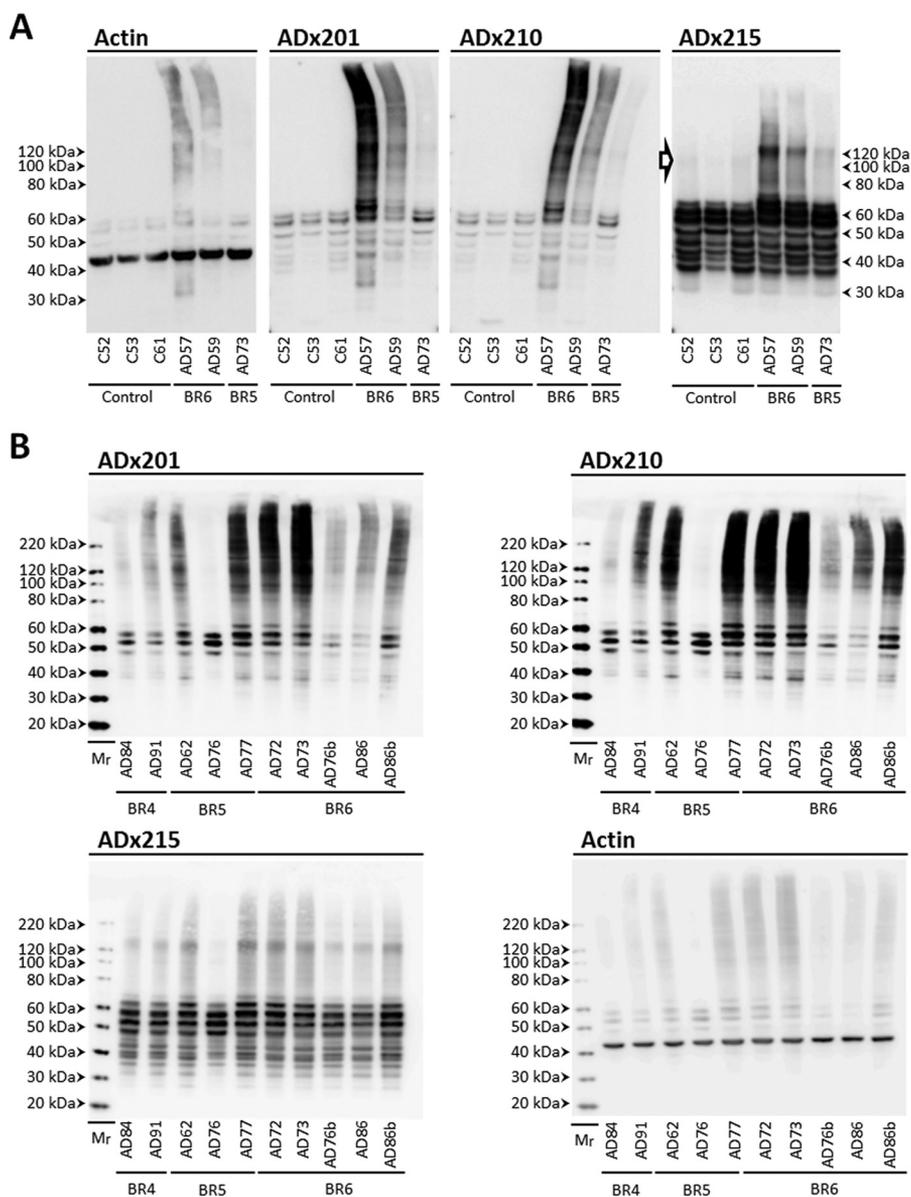


FIGURE 5. **Biochemical validation in diseased human brain.** *A*, Western blot analysis of frontal cortex brain extracts obtained from healthy persons (C numbers) and AD patients (AD numbers) at Braak stages 5 and 6 (BR5 and BR6, respectively) using the mAb ADx201, ADx210, or ADx215. The open arrow beside the picture obtained with ADx215 indicates Tau oligomers with a molecular mass below 100 kDa in brain samples of healthy controls. *B*, Western blot analysis of parietal cortex brain extracts obtained from AD patients (AD numbers) at Braak stages 4 (BR4), 5 (BR5), and 6 (BR6) using the mAbs ADx201, ADx210, and ADx215, as indicated. The molecular masses are given on each picture. Filters probed with ADx201 were stripped and used to detect actin, which served as loading control in *A* and *B*. Details on the samples can be found in Table 4.

ADx215 and an antibody raised against the lipid raft marker flotillin-1, we also used polyclonal antibodies raised against the very N terminus of protein Tau (*i.e.* M19G) or the C terminus of protein Tau (*i.e.* TauCter) (34). As shown, the study clearly confirmed the accumulation of Tau monomeric isoforms and the 130-kDa oligomers in the lipid raft enriched fractions (Fig. 6C). Interestingly, the two polyclonal antibodies TauCter and M19G additionally detected an 85-kDa Tau folding variant, which is mainly recovered in the Triton-soluble fractions.

Performance of the mAbs for Immunohistochemistry—The performance of the mAbs for immunohistochemistry was tested on sections of the hippocampal region of 12-month-old THY-Tau22 transgenic mice brains as well as on hippocampal and cortical sections of advanced AD patients (Braak stage 6).

Here, we used both the native mAbs ADx201, ADx210, and ADx215 and biotinylated counterparts, whereas the phospho-dependent antibody AT8 served as control. As shown for mouse brain (Fig. 7), all mAbs robustly stained tangle-like structures that appeared as a dense perinuclear rim in neurons of the CA1 pyramidal layer, the CA3 field, and the dentate gyrus. With ADx215, positive neurons were also clearly observed in the lateral posterior nucleus of the thalamus. In the human brain, the different mAbs densely stained neurons with tangle-like structures in both the hippocampus (Fig. 8). In the cortex, tangle-like structures were only detected with ADx201 and ADx210 (Fig. 8) and not with ADx215 because this mAb gave a very high background as compared with the labeling obtained with the other mAbs (data not shown). Interestingly,

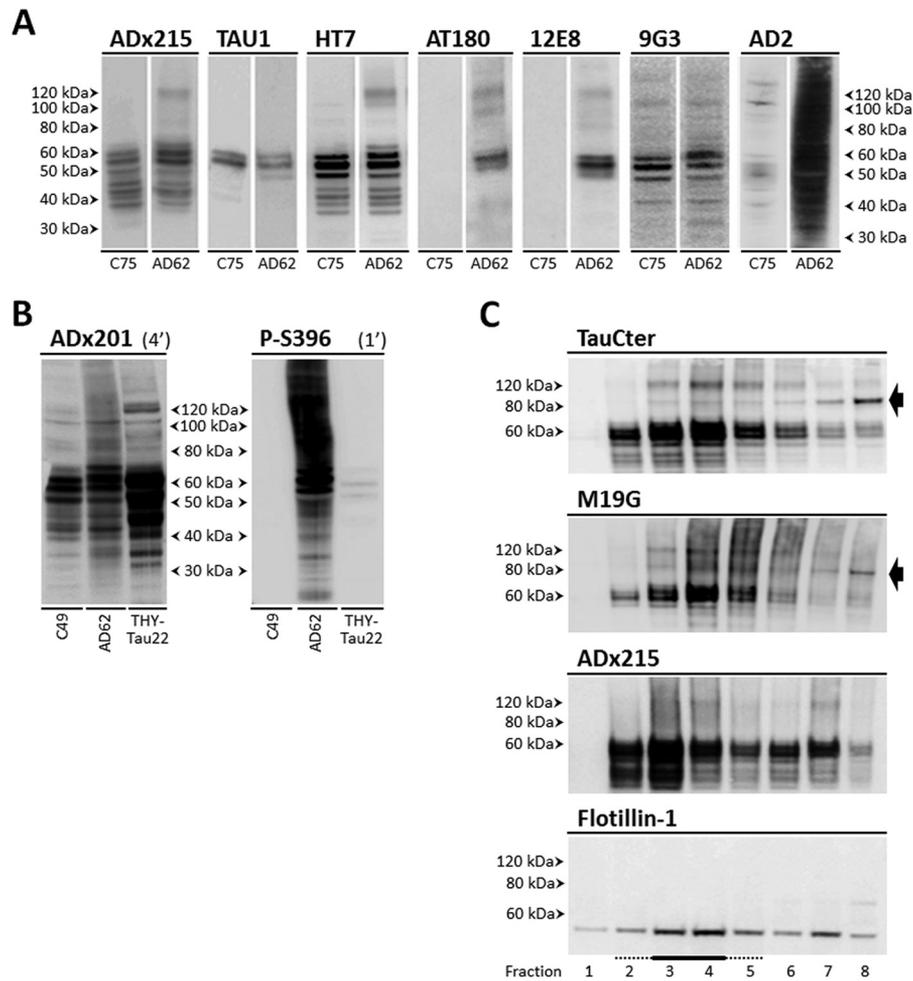


FIGURE 6. Phosphoepitope mapping in Tau oligomers and Tau-lipid raft interaction. *A*, Western blot analysis of frontal cortex brain extracts obtained from a healthy person (*C75*) and an AD patient (*AD62*) at Braak stage 5 using different phosphorylation-specific mAbs as indicated. *B*, comparison of ADx201 detection and Tau Ser³⁹⁶ phosphorylation using the mAb P-S396 in frontal cortex brain extracts obtained from a healthy person (*C49*), an AD patient at Braak stage 5 (*AD62*), and the transgenic THY-Tau22 mouse model at the age of 12 months. Exposure times (min) for the two mAbs are indicated *above* the pictures. *C*, detection of Tau in membrane fractions obtained from post-mortem human frontal cortex samples of an AD patient at Braak stage 5 (*AD62*) using the mAb ADx215 and the polyclonal antibodies M19G and TauCter. Lipid rafts were identified using the mammalian lipid raft marker flotillin-1 and were enriched in fractions 3 and 4 (*underlined*). The *black arrow* beside the pictures indicates the 85-kDa Tau folding variant detected by the polyclonal antibodies. Details on the samples can be found in Table 4.

ADx201 and ADx210 also labeled neuritic plaques in the human cortex.

Diagnostic Potential of the mAbs—Having validated the generated mAbs *in vivo*, we next completed a pilot study to evaluate their potential use for the quantitative detection of Tau in CSF and the ability to discriminate between healthy persons and patients suffering from AD and VAD (Table 5). To this end, we performed ELISA using ADx201 as capturing antibody and biotinylated ADx215 as detector antibody. For optimal comparison, we also included a calibrator peptide, allowing us to convert OD values into concentration values (pg/ml). Consistent with data reported previously (35–37), the levels of total Tau were significantly increased in samples of VAD and AD patients as compared with those of the healthy controls (Fig. 9). Using receiver operating characteristic analysis, the area under the curve for AD *versus* controls is 0.87 (with a confidence interval set at 95%, ranges were 0.75–0.98), and at a cut-off level of 404 pg/ml, the sensitivity and specificity were 80%. 13 of the 20 VAD patients had CSF Tau levels below this cut-off level, meaning 65% specificity as compared with AD.

DISCUSSION

It is well established that the deposition of protein Tau into NFT correlates with neuronal cytopathology in AD. This self-assembly of the protein is believed to be triggered by its hyperphosphorylation and concomitant conformational changes (4). The latter is supported by several studies, including CSF-based studies indicating a correlation between phospho-Tau and cognitive decline in patients with mild cognitive impairment as well as the neocortical neurofibrillary pathology in AD (38, 39). Despite these correlations, it is still a matter of debate whether or not NFT should be considered as toxic agents in AD and other tauopathies, especially because more and more data suggest NFT to be the inert or even protective end stage deposits in a cascade where soluble oligomeric and prefibrillar forms of Tau may represent the true pathogenic entities (see Refs. 40 and 41 and references therein). The interest in these oligomeric and prefibrillar forms of Tau has gained further momentum by the data obtained with Tau oligomer-specific antibodies and the presumed role of prefibrillar Tau oligomers in the propagation

Novel Tau Monoclonal Antibodies

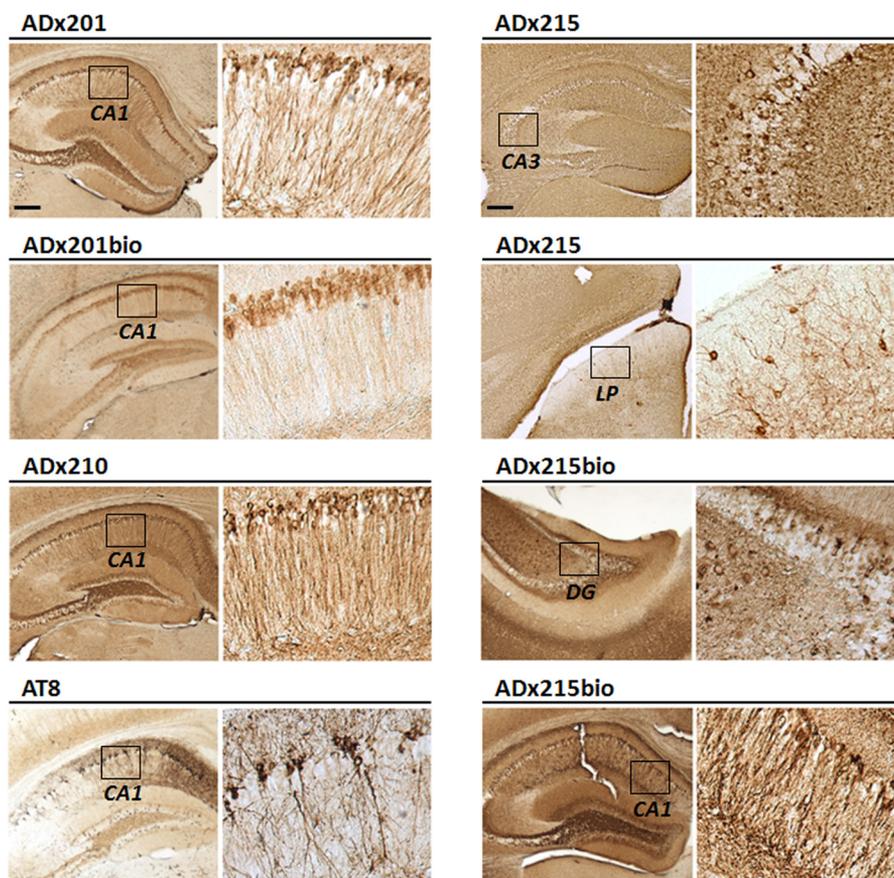


FIGURE 7. **Immunohistochemical validation in transgenic rodents.** Shown are representative pictures obtained with immunohistochemical analysis using the mAbs ADx201, ADx210, and ADx215 on different regions in the hippocampus of THY-Tau22 mouse brain. AT8 was used as a reference antibody. The brain regions analyzed are indicated in the boxes in the left lower resolution pictures and correspond to the higher resolution pictures shown on the right. Scale bar, 200 μm . CA, Ammon's horn; DG, dentate gyrus.

of Tau pathology during disease progression (8, 9, 11, 12). Similarly to amyloid β oligomers, Tau oligomers were suggested to act as seeds that are able to recruit and drive further oligomerization of monomeric Tau isoforms. In addition, the formation of the seeding oligomers was suggested to be influenced by post-translational modifications, including aberrant Tau phosphorylation (42).

The generation of monoclonal antibodies against different characteristics of Tau pathology has long been based on the extraction of NFT from AD brains and on recombinant Tau purified from *Escherichia coli* or synthetic peptides (8, 10, 12). Studies on oligomerization relied on chemically treated recombinant Tau or required preformed aggregates as seeding material (43, 44). Such studies generate Tau dimers and trimers of various size ranging from an apparent 110 to 180 kDa (8, 9, 12, 45). The humanized yeast model discussed here offers an alternative *in cellulo* system for the production of post-translational modified mono- and oligomeric Tau, without the need of additional cross-linkers or seeding materials. In line with our previous studies, the purification of human Tau from the yeast model generates relatively pure Tau bearing many of the post-translational modifications typifying the protein in AD (17–19). Based on this, we generated an array of new high affinity mAbs with differential phospho- and oligospecificity. Indeed, besides monomeric Tau, two of the mAbs (*i.e.* ADx201 and ADx210) have affinity toward higher order oligomeric Tau structures,

whereas the third (*i.e.* ADx215) recognizes low order Tau oligomers with an apparent size of 130 kDa that may represent Tau dimers. It has been suggested that Tau oligomers consist of an antiparallel intermolecular interaction of the MTBR domains (9, 46). Also, the oxidation of cysteine residues and the formation of intramolecular or intermolecular disulfide bridges was proposed as a determining factor for oligomer formation and PHF assembly, whereby intramolecular bonds would lead to compacted monomers that do not further assemble, whereas intermolecular bonds would give rise to stabilized dimers and thereby accelerate further oligomerization (47). Interestingly, our previous studies in the yeast already revealed the presence of oligomers with an apparent molecular mass of 130 kDa in yeast extracts, which then could only be detected under non-reducing SDS-PAGE conditions (19). Hence, it remains to be clarified whether those oligomers correspond to the ADx215-positive oligomers detected in the current studies because these are visualized under standard SDS-PAGE conditions with sampling buffer containing DTT as a reducing agent.

In general, the data produced with ADx215 correspond well to those obtained in recent studies that used the oligomer-specific mAbs T22 and TOC1. Similar to ADx215, T22 and TOC1 also revealed significantly increased levels of low order Tau oligomers in samples of AD patients as compared with healthy controls. Co-localization of T22- and TOC1-positive inclusions with early markers of NFT evolution demonstrated increased

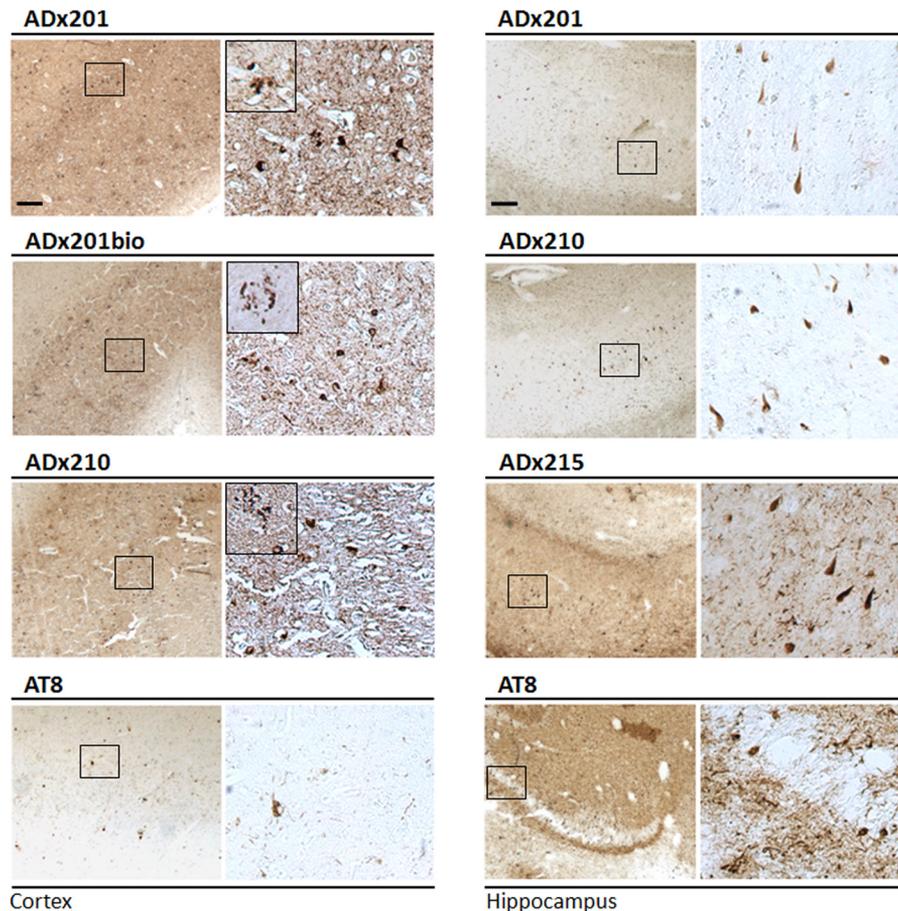


FIGURE 8. **Immunohistochemical validation in brain of AD patients.** Immunohistochemical analysis with ADx201, ADx210, and ADx215 of the cortex and hippocampus in the brain of an AD patient at Braak stage 6. AT8 was used as a reference antibody. The boxes in the left pictures correspond to the higher resolution pictures shown in the right panels. Insets in the higher resolution pictures of the cortex sections show neuritic plaques. Scale bar, 200 μ m.

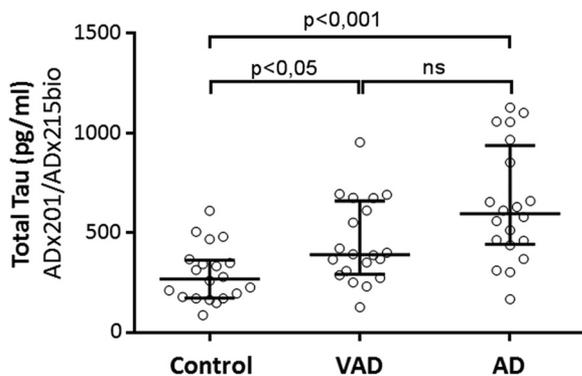


FIGURE 9. **Diagnostic performance of the novel mAbs in CSF.** Shown are the scatter dot blot of levels of total Tau in CSF obtained from healthy persons ($n = 20$) and patients suffering from AD ($n = 20$) or VAD ($n = 20$). The line presented in each scatter dot blot is the median level, and bars show the interquartile range. *ns*, non-significant. Details on the samples can be found in Table 5. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

prefibrillar Tau oligomerization to mark a very early disease stage (8, 9). Furthermore, although we found the ADx215-positive oligomers to be phosphorylated mainly in the N-terminal part and MTBR domain of Tau, the study with T22 nicely documented oligomerization to start once Tau is phosphorylated at Thr²³¹ (8). Phosphorylation of Thr²³¹ by Gsk-3 β is known to prevent Tau from binding microtubules (4) and to relieve the inhibitory activity of the N terminus over the C terminus of Tau

so as to allow kinases such as Gsk-3 β to access and subsequently phosphorylate Tau at other epitopes (48). Indeed, monomeric Tau is thought to adopt a so-called “paperclip” conformation when in solution, where the C-terminal end of Tau folds over the MTBR domain and the N terminus folds back to come in close proximity to the C terminus (49, 50). It is conceivable that the opening of this paperclip conformation is a first essential step for Tau oligomerization. However, it remains to be studied in more detail whether this relies solely on phosphorylation of Thr²³¹ or requires the additional phosphorylation of some of the other sites we identified by phosphopeptide mapping in the ADx215-positive oligomers. In our opinion, these additional phosphorylation events may help to stabilize the oligomers while being formed. This idea comes from the observation that the ADx215-positive oligomers are only weakly detected and of lower molecular weight in healthy brain as compared with AD brain, and this indeed suggests differences in the phosphorylation status and stability of the Tau oligomers between both conditions.

Besides its supposed importance to initiate the formation of Tau oligomers, the opening of the paperclip and exposure of the Tau N terminus has additional consequences. Recent studies have shown that the N terminus harbors a phosphatase-activating domain (PAD) between the residues Ala² and Tyr¹⁸ that, when exposed in Tau filaments, activates protein phosphatase 1

Novel Tau Monoclonal Antibodies

and GSK3 and results in the phosphorylation of kinesin light chains, the dissociation of kinesin from its cargo, and the disruption of fast axonal transport (FAT) (51, 52). PAD overlaps in part with the minimal epitope of ADx215, and thus it appears that PAD might be exposed in the ADx215-positive oligomers detected in our present study. Moreover, a follow-up study recently showed that phosphorylation or pseudophosphorylation of Tyr¹⁸ and, to a lesser extent, of Tyr²⁹ abrogates the inhibitory effect of PAD on FAT (53), whereas we found that Tyr¹⁸ phosphorylation disrupts Tau detection by ADx215. Of particular importance are the immunohistochemical studies that used the anti-phospho-Tyr¹⁸ mAb 9G3 and the PAD-specific mAb TNT1 to classify increased PAD exposure as an early pathogenic event occurring before and more frequently than Tyr¹⁸ phosphorylation in the path of NFT formation in AD (53). This led the authors to suggest that Tyr¹⁸ phosphorylation is part of a compensatory mechanism aiming to reduce the toxicity associated with exposure of the Tau N terminus. Whether exposure of PAD in the ADx215-positive oligomers already affects FAT and thus defines these oligomers as soluble toxic entities needs to be examined in more detail because an inhibitory effect of PAD on FAT has so far only been observed with Tau filaments (51, 53).

Concerning the Tau C terminus, we observed that exposure of phosphoepitopes in this region comes along with the appearance of higher order Tau oligomers and prefibrillary structures. There are several observations pointing toward an important role of Tau C-terminal phosphorylation in determining the Tau polymerization propensity and Tau toxicity. Similarly to the N terminus, pseudophosphorylation of Ser³⁹⁶ and Ser⁴⁰⁴ in the AD2/PHF1 epitope of Tau was shown to move the C-terminal domain away from the MTBR region and thus to open the paperclip configuration. However, the combined pseudophosphorylation in N- and C-terminal epitopes was found to result in compaction of the paperclip, such that the N terminus approaches the MTBR region to form the conformation-dependent MC1/Alz50 epitope (49). The latter defines a pathogenic conformation of Tau that enhances its assembly into paired helical filaments (54). Consistently, we previously reported on a strong correlation between phosphorylation of Tau at the AD2/PHF1 and PG5 (Ser(P)⁴⁰⁹) epitopes, the immunoreactivity with the MC1 antibody, and the level of Sarkosyl-insoluble Tau in Tau-expressing yeast cells and demonstrated the capacity of this MC1-positive fraction to seed spontaneous Tau polymerization *in vitro* (18, 19). Similar correlations have been reported based on studies in transgenic mice (55). In the human brain, the AD2/PHF1 and PG5 phosphoepitopes and the MC1/Alz50 conformational epitope are established markers for tauopathy, as seen in AD (56–59), and several studies confirmed the appearance of the MC1/Alz50 conformation to precede the formation of PHF and NFT (60–62). It is therefore tempting to speculate that C-terminal phosphorylation of Tau and the establishment of the MC1/Alz50 epitope define the transition between Tau low order and higher order oligomeric structures. Another important aspect is disease propagation by the secretion and uptake of Tau oligomers that act as seeding templates for Tau misfolding and toxicity (63). In this context, we recently developed a lentivirus-mediated rat model that

allowed us to monitor the spreading of Tau pathology from the CA1 region of the hippocampus to other brain areas, including the most distant ones (64, 65). We then already used ADx215 as marker to demonstrate that the propagating Tau entity was not phosphorylated at Tyr¹⁸ (65). Because ADx215 does not recognize higher order oligomers, the data suggest that Tau monomers or the 130-kDa low order oligomers are propagating Tau entities. In line with this are the data from a study that tested the ability of anti-Tau mAbs to block the trans-cellular seeding activity when infused into the lateral ventricle of P301S transgenic mice (11). Here the most potent mAb was HJ8.5, which recognizes an N-terminal epitope between Asp²⁵ and Thr³⁰. Because this epitope is just adjacent to the minimal epitope identified for ADx215, it indeed suggests that exposure of the N terminus may be crucial for seeding. Hence, it would be useful to confirm the ability of ADx215 to block the Tau seeding and propagation activity because this would make it a good candidate for immune therapy.

Finally, we tested the use of our novel high affinity mAbs for diagnostics and documented that the combined use of ADx201 and ADx215 as capturing and detecting antibodies, respectively, has the potential to discriminate patients clinically diagnosed with VAD or AD from healthy persons based on increased levels in CSF of total Tau. This is in agreement with previously published studies (35–37). Recently, improved characterization of CSF Tau using reverse-phase high performance liquid chromatography led to the evaluation of five total Tau assays side by side, and the two assays containing N-terminal sequences exhibited the most significant differences between AD and control CSF (66). This suggests that the use of mAbs such as ADx215, recognizing the N terminus of Tau, may indeed improve diagnostic accuracy. That ADx215 might also recognize a presumed propagating Tau seeding conformation only adds relevance for its discriminative capacity between the healthy and diseased persons.

In conclusion, we expressed human Tau-2N/4R in *pho85Δ* yeast cells and used the purified protein as antigen to generate novel mAbs. These mAbs recognize specific Tau oligomeric species in diseased brain besides monomeric Tau upon Western blot analysis, and they have capacity to stain tangle-like structures and neuritic plaques in diseased brain sections upon immunohistochemical analysis. Moreover, the mAbs proved to be ideal tools to discriminate patients suffering from AD or VAD from healthy controls using CSF-based ELISA. As such, our studies unequivocally demonstrate that Tau must adopt pathologically relevant conformations when expressed in yeast and illustrate how the use of this simple eukaryotic model organism can contribute in the quest to understand the etiology of tauopathies.

Acknowledgments—We thank the CNRS Large Scale Facility NMR THCFr3050 for support; M. Michels, A. Chauderlier, and M-E. Grosjean for excellent technical assistance; Dr. F.-X. Cantrelle for maintenance of the 900-MHz NMR spectrometer; and Prof. Dr. F. Van Leuven for advice and additional validation in mice models. We also thank Dr. M. Schraeml (Roche Applied Science) and Dr. T. Bittner (Roche Applied Science) for providing the Biacore affinity data and Dr. Lester (Skip) Binder for providing the TOC1 antibody.

REFERENCES

- Buée, L., Bussi re, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P. R. (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **33**, 95–130
- Irwin, D. J., Cohen, T. J., Grossman, M., Arnold, S. E., Xie, S. X., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (2012) Acetylated tau, a novel pathological signature in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Brain* **135**, 807–818
- Wang, Y., Garg, S., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2010) Proteolytic processing of tau. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 955–961
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M. L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., Schraen-Maschke, S., and Bu e, L. (2008) Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* **5**, 207–224
- Irwin, D. J., McMillan, C. T., Toledo, J. B., Arnold, S. E., Shaw, L. M., Wang, L. S., Van Deerlin, V., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., and Grossman, M. (2012) Comparison of cerebrospinal fluid levels of tau and A β 1–42 in Alzheimer disease and frontotemporal degeneration using 2 analytical platforms. *Arch. Neurol.* **69**, 1018–1025
- Le Bastard, N., Coart, E., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Martin, J. J., and Engelborghs, S. (2013) Comparison of two analytical platforms for the clinical qualification of Alzheimer's disease biomarkers in pathologically-confirmed dementia. *J. Alzheimers Dis.* **33**, 117–131
- Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., Wszolek, Z., Ashe, K., Knight, J., Dickson, D., Andorfer, C., Rosenberry, T. L., Lewis, J., Hutton, M., and Janus, C. (2007) Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J. Neurosci.* **27**, 3650–3662
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G. R., and Kaye, R. (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **26**, 1946–1959
- Patterson, K. R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N. M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J. F., Philibert, K., Glucksman, M. J., and Binder, L. I. (2011) Characterization of prefibrillar Tau oligomers *in vitro* and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **286**, 23063–23076
- Ward, S. M., Himmelstein, D. S., Lancia, J. K., Fu, Y., Patterson, K. R., and Binder, L. I. (2013) TOC1: characterization of a selective oligomeric Tau antibody. *J. Alzheimers Dis.* **37**, 593–602
- Yanamandra, K., Kfoury, N., Jiang, H., Mahan, T. E., Ma, S., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Diamond, M. I., and Holtzman, D. M. (2013) Anti-Tau antibodies that block Tau aggregate seeding *in vitro* markedly decrease pathology and improve cognition *in vivo*. *Neuron* **80**, 402–414
- Castillo-Carranza, D. L., Gerson, J. E., Sengupta, U., Guerrero-Muñoz, M. J., Lasagna-Reeves, C. A., and Kaye, R. (2014) Specific targeting of Tau oligomers in Htau mice prevents cognitive impairment and Tau toxicity following injection with brain-derived Tau oligomeric seeds. *J. Alzheimers Dis.* **40**, S97–S111
- Winderickx, J., Delay, C., De Vos, A., Klinger, H., Pellens, K., Vanhelmont, T., Van Leuven, F., and Zbrocki, P. (2008) Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1381–1395
- D'Angelo, F., Vignaud, H., Di Martino, J., Salin, B., Devin, A., Cullin, C., and Marchal, C. (2013) A yeast model for amyloid- β aggregation exemplifies the role of membrane trafficking and PICALM in cytotoxicity. *Dis. Model. Mech.* **6**, 206–216
- Treusch, S., Hamamichi, S., Goodman, J. L., Matlack, K. E., Chung, C. Y., Baru, V., Shulman, J. M., Parrado, A., Bevis, B. J., Valastyan, J. S., Han, H., Lindhagen-Persson, M., Reiman, E. M., Evans, D. A., Bennett, D. A., Olofsson, A., DeJager, P. L., Tanzi, R. E., Caldwell, K. A., Caldwell, G. A., and Lindquist, S. (2011) Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science* **334**, 1241–1245
- De Vos, A., Anandhakumar, J., Van den Brande, J., Verduyck, M., Franssens, V., Winderickx, J., and Swinnen, E. (2011) Yeast as a model system to study tau biology. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, 428970
- Vandebroek, T., Terwel, D., Vanhelmont, T., Gysemans, M., Van Haesen-donck, C., Engelborghs, Y., Winderickx, J., and Van Leuven, F. (2006) Microtubule binding and clustering of human Tau-4R and Tau-P301L proteins isolated from yeast deficient in orthologues of glycogen synthase kinase-3 β or Cdk5. *J. Biol. Chem.* **281**, 25388–25397
- Vandebroek, T., Vanhelmont, T., Terwel, D., Borghgraef, P., Lemaire, K., Snauwaert, J., Wera, S., Van Leuven, F., and Winderickx, J. (2005) Identification and isolation of a hyperphosphorylated, conformationally changed intermediate of human protein tau expressed in yeast. *Biochemistry* **44**, 11466–11475
- Vanhelmont, T., Vandebroek, T., De Vos, A., Terwel, D., Lemaire, K., Anandhakumar, J., Franssens, V., Swinnen, E., Van Leuven, F., and Winderickx, J. (2010) Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. *FEMS Yeast Res.* **10**, 992–1005
- Kato, Y., Jin, G., Kuan, C. T., McLendon, R. E., Yan, H., and Bigner, D. D. (2009) A monoclonal antibody IMab-1 specifically recognizes IDH1R132H, the most common glioma-derived mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 547–551
- Lippens, G., Wieruszkeski, J. M., Leroy, A., Smet, C., Sillen, A., Bu e, L., and Landrieu, I. (2004) Proline-directed random-coil chemical shift values as a tool for the NMR assignment of the tau phosphorylation sites. *Chembiochem* **5**, 73–78
- Gottschalk, P. G., and Dunn, J. R. (2005) The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal. Biochem.* **343**, 54–65
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J. P., Hamdane, M., and Bu e, L. (2006) Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am. J. Pathol.* **169**, 599–616
- Delacourte, A., and Defossez, A. (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* **76**, 173–186
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Jr., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., and Phelps, C. H. (2011) The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **7**, 263–269
- Román, G. C., Tatemichi, T. K., Erkinjuntti, T., Cummings, J. L., Masdeu, J. C., Garcia, J. H., Amaducci, L., Orgogozo, J. M., Brun, A., and Hofman, A. (1993) Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies: report of the NINDS-AIREN International Workshop. *Neurology* **43**, 250–260
- B uttner, S., Delay, C., Franssens, V., Bammens, T., Ruli, D., Zaunschirm, S., de Oliveira, R. M., Outeiro, T. F., Madeo, F., Bu e, L., Galas, M. C., and Winderickx, J. (2010) Synphilin-1 enhances α -synuclein aggregation in yeast and contributes to cellular stress and cell death in a Sir2-dependent manner. *PLoS One* **5**, e13700
- R osner, H., Rebhan, M., Vacun, G., and Vanmechelen, E. (1994) Expression of a paired helical filament tau epitope in embryonic chicken central nervous system. *Neuroreport* **5**, 1164–1166
- Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Cohen, P., Vanmechelen, E., Vandermeeren, M., and Cras, P. (1994) Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem. J.* **301**, 871–877
- Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Davidsson, P., Van Kerschaver, E., Van Der Perre, B., Sjögren, M., Andreasen, N., and Blennow, K. (2000) Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci. Lett.* **285**, 49–52
- Bhaskar, K., Hobbs, G. A., Yen, S. H., and Lee, G. (2010) Tyrosine phosphorylation of tau accompanies disease progression in transgenic mouse models of tauopathy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **36**, 462–477
- Amniai, L., Lippens, G., and Landrieu, I. (2011) Characterization of the AT180 epitope of phosphorylated Tau protein by a combined nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopy approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**, 743–746

33. Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L. H., Wen-Lang, L., Dickson, D. W., Murakami, T., Matsubara, E., Abe, K., Ashe, K. H., and Younkin, S. G. (2004) Dimeric amyloid β protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **24**, 3801–3809
34. Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurice, C. A., Wattez, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2143–2155
35. Olsson, A., Vanderstichele, H., Andreasen, N., De Meyer, G., Wallin, A., Holmberg, B., Rosengren, L., Vanmechelen, E., and Blennow, K. (2005) Simultaneous measurement of β -amyloid(1–42), total tau, and phosphorylated tau (Thr181) in cerebrospinal fluid by the xMAP technology. *Clin. Chem.* **51**, 336–345
36. Sjögren, M., Davidsson, P., Gottfries, J., Vanderstichele, H., Edman, A., Vanmechelen, E., Wallin, A., and Blennow, K. (2001) The cerebrospinal fluid levels of tau, growth-associated protein-43 and soluble amyloid precursor protein correlate in Alzheimer's disease, reflecting a common pathophysiological process. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **12**, 257–264
37. Hertzog, J., Minthon, L., Zetterberg, H., Vanmechelen, E., Blennow, K., and Hansson, O. (2010) Evaluation of CSF biomarkers as predictors of Alzheimer's disease: a clinical follow-up study of 4.7 years. *J. Alzheimers Dis.* **21**, 1119–1128
38. Buerger, K., Ewers, M., Andreasen, N., Zinkowski, R., Ishiguro, K., Vanmechelen, E., Teipel, S. J., Graz, C., Blennow, K., and Hampel, H. (2005) Phosphorylated tau predicts rate of cognitive decline in MCI subjects: a comparative CSF study. *Neurology* **65**, 1502–1503
39. Buerger, K., Ewers, M., Pirttilä, T., Zinkowski, R., Alafuzoff, I., Teipel, S. J., DeBernardis, J., Kerkman, R., McCulloch, C., Soininen, H., and Hampel, H. (2006) CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain* **129**, 3035–3041
40. Cowan, C. M., and Mudher, A. (2013) Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies? *Front. Neurol.* **4**, 114
41. Iqbal, K., Gong, C. X., and Liu, F. (2013) Hyperphosphorylation-induced tau oligomers. *Front. Neurol.* **4**, 112
42. Gerson, J. E., and Kaye, R. (2013) Formation and propagation of tau oligomeric seeds. *Front. Neurol.* **4**, 93
43. Dinkel, P. D., Siddiqua, A., Huynh, H., Shah, M., and Margittai, M. (2011) Variations in filament conformation dictate seeding barrier between three- and four-repeat tau. *Biochemistry* **50**, 4330–4336
44. Guo, J. L., and Lee, V. M. (2011) Seeding of normal Tau by pathological Tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J. Biol. Chem.* **286**, 15317–15331
45. Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Guerrero-Muoz, M. J., Jackson, G. R., and Kaye, R. (2010) Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry* **49**, 10039–10041
46. Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1992) Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau *in vitro*. *J. Cell Biol.* **118**, 573–584
47. Barghorn, S., and Mandelkow, E. (2002) Toward a unified scheme for the aggregation of tau into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **41**, 14885–14896
48. Lin, Y. T., Cheng, J. T., Liang, L. C., Ko, C. Y., Lo, Y. K., and Lu, P. J. (2007) The binding and phosphorylation of Thr231 is critical for Tau's hyperphosphorylation and functional regulation by glycogen synthase kinase 3 β . *J. Neurochem.* **103**, 802–813
49. Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (2008) Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J. Biol. Chem.* **283**, 32066–32076
50. Jeganathan, S., von Bergen, M., Brutlach, H., Steinhoff, H. J., and Mandelkow, E. (2006) Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* **45**, 2283–2293
51. Kanaan, N. M., Morfini, G. A., LaPointe, N. E., Pigino, G. F., Patterson, K. R., Song, Y., Andreadis, A., Fu, Y., Brady, S. T., and Binder, L. I. (2011) Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J. Neurosci.* **31**, 9858–9868
52. LaPointe, N. E., Morfini, G., Pigino, G., Gaisina, I. N., Kozikowski, A. P., Binder, L. I., and Brady, S. T. (2009) The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J. Neurosci. Res.* **87**, 440–451
53. Kanaan, N. M., Morfini, G., Pigino, G., LaPointe, N. E., Andreadis, A., Song, Y., Leitman, E., Binder, L. I., and Brady, S. T. (2012) Phosphorylation in the amino terminus of tau prevents inhibition of anterograde axonal transport. *Neurobiol. Aging* **10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.006**
54. Gamblin, T. C., Berry, R. W., and Binder, L. I. (2003) Tau polymerization: role of the amino terminus. *Biochemistry* **42**, 2252–2257
55. Sahara, N., Lewis, J., DeTure, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Hutton, M., and Yen, S. H. (2002) Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility. *J. Neurochem.* **83**, 1498–1508
56. Galván, M., David, J. P., Delacourte, A., Luna, J., and Mena, R. (2001) Sequence of neurofibrillary changes in aging and Alzheimer's disease: a confocal study with phospho-tau antibody, AD2. *J. Alzheimers Dis.* **3**, 417–425
57. Kimura, T., Ono, T., Takamatsu, J., Yamamoto, H., Ikegami, K., Kondo, A., Hasegawa, M., Ihara, Y., Miyamoto, E., and Miyakawa, T. (1996) Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* **7**, 177–181
58. Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M. C., and Williams, S. (2014) Phosphorylation of tau protein at sites Ser 396–404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **40**, 121–135
59. Jicha, G. A., Lane, E., Vincent, I., Otvos, L., Jr., Hoffmann, R., and Davies, P. (1997) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **69**, 2087–2095
60. Haroutunian, V., Davies, P., Vianna, C., Buxbaum, J. D., and Purohit, D. P. (2007) Tau protein abnormalities associated with the progression of Alzheimer disease type dementia. *Neurobiol. Aging* **28**, 1–7
61. Luna-Muñoz, J., Chávez-Macias, L., García-Sierra, F., and Mena, R. (2007) Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **12**, 365–375
62. Weaver, C. L., Espinoza, M., Kress, Y., and Davies, P. (2000) Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **21**, 719–727
63. Gendreau, K. L., and Hall, G. F. (2013) Tangles, toxicity, and Tau secretion in AD: new approaches to a vexing problem. *Front. Neurol.* **4**, 160
64. Caillierez, R., Bégard, S., Lécolle, K., Deramecourt, V., Zommer, N., Dujardin, S., Loyens, A., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Buée, L., and Colin, M. (2013) Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. *Mol. Ther.* **21**, 1358–1368
65. Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Colin, M., and Buée, L. (2014) Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 14
66. Meredith, J. E., Jr., Sankaranarayanan, S., Guss, V., Lanzetti, A. J., Berisha, F., Neely, R. J., Slemmon, J. R., Portelius, E., Zetterberg, H., Blennow, K., Soares, H., Ahljanian, M., and Albright, C. F. (2013) Characterization of novel CSF Tau and ptau biomarkers for Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e76523

**Tau Monoclonal Antibody Generation Based on Humanized Yeast Models:
IMPACT ON TAU OLIGOMERIZATION AND DIAGNOSTICS**

Joëlle Rosseels, Jeff Van den Brande, Marie Violet, Dirk Jacobs, Pierre Grognet, Juan Lopez, Isabelle Huvent, Marina Caldara, Erwin Swinnen, Anthony Papegaey, Raphaëlle Caillierez, Valerie Buée-Scherrer, Sebastiaan Engelborghs, Guy Lippens, Morvane Colin, Luc Buée, Marie-Christine Galas, Eugene Vanmechelen and Joris Winderickx

J. Biol. Chem. 2015, 290:4059-4074.

doi: 10.1074/jbc.M114.627919 originally published online December 24, 2014

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.627919](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627919)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 66 references, 18 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/290/7/4059.full.html#ref-list-1>