



École doctorale Biologie Santé

## THÈSE

Présentée par

**Marie ALBERT**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

Spécialité : Neurosciences

---

Prévention du phénomène de nucléation et de la propagation des tauopathies par immunothérapie passive utilisant un anticorps ciblant une région centrale de la protéine tau

---

Soutenue publiquement le 10 Décembre 2018 devant le Jury composé de :

<b>M. le Pr. Charles Duyckaerts</b>	Président de Jury
<b>Mme. Le Dr. Sandrine Humbert</b>	Rapporteur
<b>M. le Pr. Jean-Pierre Brion</b>	Rapporteur
<b>Mme. Le Pr. Ilse Dewachter</b>	Examineur
<b>M. le Dr. Jean-Philippe Courade</b>	Examineur
<b>Mme. Le Dr. Morvane Colin</b>	Directrice de thèse

## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le **Pr. Charles Duyckaerts**, le **Pr. Jean-Pierre Brion**, le **Pr. Ilse Dewachter**, le **Dr. Jean-Philippe Courade**, le **Dr. Sandrine Humbert** et enfin le **Dr. Morvane Colin** pour avoir accepté d'être membres de ce jury de thèse. Je remercie plus particulièrement le **Pr. Charles Duyckaerts** et le **Pr. Jean-Pierre Brion**, rapporteurs de ce travail de thèse, pour le temps qu'ils consacreront à l'évaluation de ce manuscrit, les **Dr. Jean-Philippe Courade** et le **Dr. Sandrine Humbert** pour avoir suivi l'évolution de ce travail et pour leurs conseils et remarques avisées lors des comités de suivi de thèse. Enfin, je remercie chaleureusement le **Pr. Ilse Dewachter**, qui en plus de m'avoir transmis sa passion pour les neurosciences au travers de ses cours et travaux pratiques, a accepté de venir évaluer mon travail de thèse.

Je remercie le **Dr. Luc Buée** d'avoir répondu positivement à l'email que je lui avais envoyé il y a trois ans de ça, de m'avoir fait confiance et accueilli au sein de l'équipe « Alzheimer et tauopathies ». Merci pour votre vivacité d'esprit donnant lieu à des discussions scientifiques des plus intéressantes, merci aussi pour vos conseils et avis avisés.

Je remercie le **Dr. Morvane Colin**, pour avoir été la directrice de ce travail de thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée, pour l'inculcation de votre rigueur scientifique, votre grande implication dans ce projet et enfin, merci de la liberté que vous m'avez laissée dans la rédaction de ce manuscrit. Je vous remercie également de m'avoir intégrée au sein du groupe « viro ». Je remercie les membres du groupe (**Séverine, Sophie, Raphaëlle, Meryem, Sarah, Clément, Thomas** et maintenant **Elodie**) pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce projet et pour les suggestions qu'ils ont pu émettre lors de nos réunions.

Je remercie tous nos collaborateurs à UCB Biopharma, en particulier **Jean-Philippe Courade, Georges Mairet-Coello, Martin Citron, Patrick Downey** et **Mathieu Schmitt**. Ce fut un réel plaisir de travailler et d'échanger avec vous sur ce magnifique projet. Je pense être aussi impatiente que vous, en l'attente des résultats des essais cliniques d'UCB0107 et espère sincèrement que nous serons amenés à retravailler ensemble.

Je tiens à remercier les docteurs **Valérie Buée-Scherrer, Malika Hamdame, Valérie Vingtdoux, Marie-Christine Gallas, Bernard Sablonnière, Bruno Lefebvre, David Blum** et **Nicolas Sergeant** pour leur réactivité, leurs remarques et suggestions toujours très constructives.

Un grand merci aux ITA, **Sahiba, Raphaëlle, Séverine, Domi** et **Sébastien** qui prennent le temps de former les nouveaux arrivants aux différentes techniques et sont toujours présents pour répondre à nos questions et éventuels problèmes. Merci également pour le travail que vous faites en plus de vos manips pour nous rendre la vie plus facile.

Merci aux As du microscope, **Meryem** et **Antonino**, pour leurs conseils et pour la dynamique de travail géniale qu'ils entretiennent à la plate-forme de microscopie. Il faut dire que j'ai passé du temps à vos côtés, à quantifier encore et encore toutes ces petites coupes de cerveaux.

Un merci particulier à **Sarah L.** pour son aide dans la réalisation des Western Blots de l'analyse biochimique, à **Clément** pour l'utilisation du test d'agrégation, **Sébastien** et **Espérance** pour leur aide dans les géotypages des souris, **Catherine** pour ses conseils en spectrométrie de masse, **Émilie** pour ses conseils en immunofluorescence, **Anna** pour ses conseils animaliers et Anibio...

Je remercie mes collègues de bureau, **Caro, Mégane, Mélissa, Florian, Sébastien** et **Clément** pour la bonne entente et les bons moments partagés. Merci aussi à notre ancien collègue de bureau, **Théo**, qui même s'il nous a lâchement abandonnés, continue de nous faire beaucoup rire et de venir nous rendre de petites visites.

Merci beaucoup à **Thomas** pour toutes ces boîtes de cônes, ces erlenmeyers étincelants, et surtout pour ta bonne humeur contagieuse.

Un grand merci à l'équipe de choc ; **Michèle, Céline, Nathalie** et **Sophie**, le labo serait en totale pagaille sans vous. Merci à **Sophie** d'avoir pris le temps de m'expliquer et d'organiser avec moi le voyage à Chicago. Merci à **Nathalie** pour toutes ces boîtes de carbo commandées, Merci à **Michèle** l'experte INSERM pour avoir géré mon contrat et toutes les questions qui en ont suivi et enfin, merci à **Céline** pour toute l'énergie qu'elle développe à maintenir une bonne organisation du laboratoire et de m'avoir quelques fois évité de passer la nuit au JParc en m'ouvrant la porte quand je dépassais le couvre-feu.

Vous êtes tellement nombreux qu'il m'est difficile de tous vous citer et de vous remercier personnellement pour ces trois années passées à vos côtés, mais je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe « Alzheimer & tauopathies ».

D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier trois amies rencontrées au cours de ces années, qui m'ont énormément apporté et que je remercie du fond du cœur.

Merci à **Delphine**, je n'oublierai jamais ce début de thèse à tes côtés et même si nos chemins professionnels se sont éloignés, à mon plus grand bonheur nous sommes restées toutes aussi proches.

Merci à **Melissa**, trois ans dans le même bureau et toujours autant de choses à se raconter. On peut dire que la cohabitation et notre binôme fonctionnent plutôt bien. J'ai vraiment été heureuse de passer ces années en ta compagnie, merci pour avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments. J'espère que la distance ne nous séparera pas dans les années à venir mais sache que ma porte et ma table te seront toujours ouvertes.

Merci à **Charlotte** de m'avoir aidée dans mes débuts à un moment où le monde de l'immunohistochimie m'était encore inconnu. Merci pour ta spontanéité, ton écoute, ton soutien et ton aide pendant ces trois années à Lille. Et merci pour cette belle amitié qui nous unit. Je remercie aussi **Max** qui, en plus de nous supporter dans tous nos périples, est réellement devenu un ami lui aussi.

Pour finir, je remercie l'INSERM pour avoir été mon premier employeur et l'entreprise pharmaceutique UCB Biopharma pour avoir financé entièrement ce projet de thèse.

On dit qu'il faut toujours garder le meilleur pour la fin... Si mes remerciements ne devaient se limiter qu'à quelques personnes, sans une hésitation, ils seraient pour vous ! Vous qui depuis l'enfance m'encouragez dans tout ce que j'entreprends, vous qui avez toujours cru en moi, **Maman, Papa**, je n'y serais jamais arrivée sans vous. MERCI !



## RESUME

Dans les tauopathies, telle la maladie d'Alzheimer, la protéine tau devient anormalement hyperphosphorylée ce qui conduit à son accumulation et à son agrégation intracellulaire. Ce processus aboutit progressivement à une perte neuronale et un déclin cognitif. L'immunothérapie anti-tau est de plus en plus considérée comme un traitement potentiel en vue de bloquer la progression des tauopathies.

Récemment, l'entreprise UCB BioPharma a montré que l'anticorps D, anticorps ciblant la protéine tau en un épitope central (aa 235 à 250), était en mesure de bloquer, *in vitro*, l'agrégation intracellulaire de protéines tau, induite par des PHFs purifiés au départ de cerveaux Alzheimer. L'anticorps A, de même isotype, associé à des propriétés de liaison comparables mais reconnaissant la protéine tau en son extrémité N-terminale (aa 15 à 24), n'est pas en mesure de prévenir l'agrégation dans ce même modèle, ce qui souligne l'importance du choix de l'épitope en vue de neutraliser les amorces pathologiques issues de cerveaux Alzheimer.

En vue d'étudier les propriétés de l'anticorps D *in vivo*, nous avons développé deux modèles murins de tauopathies. Premièrement, un modèle étudiant les phénomènes de recrutement et nucléation, basé sur l'injection unilatérale d'un homogénat de cerveau Alzheimer dans l'hippocampe de jeunes souris transgéniques (Tg30tau). Deuxièmement, un modèle permettant l'étude de la propagation intercellulaire de formes pathologiques de tau, par injection unilatérale de fibrilles P301L-K18 dans l'hippocampe de souris transgéniques (hTauP301L). Les tauopathies induites par ces injections intracérébrales ont été quantifiées dans l'hippocampe ipsi et controlatéral, en présence de traitements immunothérapeutiques utilisant les anticorps anti-tau A et D ou un anticorps témoin négatif de même isotype. La quantification des formes hyperphosphorylées et agrégées de tau a été réalisée par des approches immunohistochimique ou biochimique.

Dans le modèle de nucléation, l'anticorps D est en mesure de prévenir significativement l'apparition des formes hyperphosphorylées et agrégées de tau à la fois dans l'hippocampe ipsilatéral (injecté avec l'homogénat Alzheimer) et contralatéral. A l'opposé, l'anticorps A n'est pas en mesure de prévenir l'apparition de la tauopathie dans ce modèle. Dans le modèle de propagation, basé sur l'injection unilatérale hippocampique de fibrilles P301L-K18, le traitement immunothérapeutique utilisant l'anticorps D réduit significativement la propagation d'espèces pathologiques de la protéine tau dans l'hippocampe controlatéral.

De par l'utilisation de ces deux modèles murins de tauopathies, nous avons pu confirmer *in vivo*, la capacité de l'anticorps D à neutraliser les espèces pathologiques contenues dans un homogénat de cerveau Alzheimer et avons démontré sa capacité à s'opposer à la propagation intercellulaire de la tauopathie *in vivo*. Dans le modèle de nucléation, l'anticorps A n'a pas été en mesure de s'opposer à l'apparition de la tauopathie. Les résultats obtenus confirment ceux décrits par l'entreprise UCB BioPharma dans leur modèle d'agrégation *in vitro* et confirme l'importance considérable du choix de l'épitope en vue de prévenir efficacement le développement de tauopathies *in vivo*.

## ABSTRACT

In tauopathies, such as Alzheimer's disease, tau protein becomes abnormally hyperphosphorylated which leads to its accumulation and intracellular aggregation. This process gradually leads to neuronal loss and cognitive decline. Anti-tau immunotherapy is increasingly considered as a potential treatment to block tauopathies's progression.

UCB BioPharma recently showed that antibody D, targeting an epitope in the central region of tau (aa 235-250), is able to block, *in vitro*, the intracellular seeding of tau proteins induced by PHFs purified from the brain of Alzheimer's patients. The antibody A, same isotype and associated with similar binding properties but recognizing the N-terminal region of tau (aa 15 to 24) is not able to prevent tau seeding in this cell based assay. This observation underlines the importance of the targeted epitope on tau protein in order to neutralize pathological species contained in Alzheimer's brains (Courade et al., 2018).

In order to study the properties of antibody D *in vivo*, we developed two murine models of tauopathies. First, a seeding model based on a unilateral injection of Alzheimer's brain homogenate into the hippocampus of young Tg30tau mice. Secondly, a spreading model to study the propagation of pathological tau seeds, based on unilateral hippocampal injection of P301L-K18 fibrils in hTauP301L transgenic mice. Tauopathies induced in these models were quantified in the ipsi and contralateral hippocampus in the presence of immunotherapeutic treatments with anti-tau antibodies (D, A) or a negative control antibody. Quantification of hyperphosphorylated and aggregated tau was performed by immunohistochemical or biochemical analyses.

In the seeding model, antibody D significantly reduces the appearance of hyperphosphorylated and aggregated tau both in the ipsi and contralateral CA1 regions of hippocampus. In contrast, antibody A is not able to prevent the appearance of pathological tau in this model. In the spreading model, immunotherapeutic treatments with antibody D significantly reduces the spread of pathological tau seeds in the contralateral hippocampus.

From these two murine models of tauopathies, we confirmed *in vivo* the ability of antibody D to neutralize the pathological tau species contained in an Alzheimer's brains homogenate and demonstrated its capacity to reduce the intercellular propagation of tauopathies. In the seeding model, antibody A wasn't able to affect the onset of tauopathy. These results confirm those described by UCB BioPharma based on their *in vitro* aggregation assay and confirm the importance of the targeted epitope in order to effectively prevent the development of tauopathies *in vivo*.





# Table des matières

## Introduction (1)

### CHAPITRE 1 : La protéine tau : généralités (1)

- I. Du gène aux isoformes (1)
- II. Structure et domaines de la protéine tau (3)
- III. Fonctions physiologiques de la protéine tau (5)

### CHAPITRE 2 : Phosphorylation de la protéine tau (7)

- I. Phosphorylation physiologique. (7)
- II. Hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau dans les tauopathies (7)
  - II.1 Enzymes responsables de l'hyperphosphorylation de la protéine tau (9)*
    - II.1.1 Implication des kinases (10)*
    - II.1.2 Implication des phosphatases (11)*
- III. Conséquences liées à l'hyperphosphorylation de la protéine tau (12)
  - III.1 Perte des fonctions physiologiques de la protéine tau (12)*
  - III.2 Agrégation et accumulation de protéines tau hyperphosphorylées (13)*
    - III.2.1 Changement conformationnel (13)*
    - III.2.2 Agrégation (13)*
    - III.2.3 Inhibition de la dégradation par les protéases (14)*
  - III.3 Dégénérescence neurofibrillaire (14)*
    - III.3.1 Inhibition de l'apoptose (14)*

### CHAPITRE 3 : Tauopathies (17)

- I. Lésions propres aux différentes tauopathies (18)
- II. Tauopathies à l'évolution spatio-temporelle prédictible (24)
  - II.1 Maladie à grains argyrophiles (AGD) (24)*
  - II.2 Maladie d'Alzheimer (AD) (26)*
  - II.3 Progression et propagation des tauopathies (30)*

III. Les tauopathies : des prion-like disease ? (31)

*III.1 Les maladies à prions (31)*

*III.2 La protéine tau pathologique : vecteur de progression des tauopathies et agent de nucléation (36)*

*III.2.1 La protéine tau pathologique : agent de nucléation en mesure de recruter la tau physiologique (36)*

*III.2.2 Implication de la phosphorylation dans la capacité de nucléation des protéines tau pathologiques (38)*

*III.2.3 Autres facteurs impliqués dans la capacité de nucléation des protéines tau pathologiques (39)*

*III.3 Transmission intercellulaire des tauopathies ? (40)*

*III.4 Mécanismes sous-jacents à la transmission intercellulaire des protéines tau pathologiques (43)*

*III.4.1 Transfert intercellulaire trans-synaptique (44)*

*III.4.2 Transfert intercellulaire médié par les exosomes (44)*

*III.4.3 Transfert intercellulaire médié par les nanotubes (45)*

*III.4.4 Transfert intercellulaire médié par les protéoglycanes sulphatés (45)*

*III.4.5 Transfert intercellulaire médié par une sécrétion/capture dans le milieu extracellulaire (46)*

*III.4.6 Facteurs influençant ou participant à la sécrétion de la protéine tau (47)*

*III.5 Différentes souches de tau pathologique associées à des profils de tauopathies distincts ? (47)*

*III.6 Forme(s) toxique(s) impliquée(s) dans la propagation (49)*

**CHAPITRE 4 : Immunothérapie dirigée contre la protéine tau (52)**

I. Avantages et inconvénients (52)

*I.1 Challenges de l'immunothérapie (53)*

II. Immunothérapie active (54)

*II.1 Études précliniques (56)*

*II.2 Etudes cliniques (58)*

III. Immunothérapie Passive (59)

### *III.1 Études précliniques (61)*

*III.1.1 Les différents épitopes (61)*

*III.1.2 Les voies d'administrations (63)*

*III.1.3 Mécanismes d'actions (64)*

*III.1.4 Implication de la microglie (66)*

*III.1.5 Choix de l'isotype (67)*

*III.1.6 Effet bénéfique sur la pathologie amyloïde (71)*

### *III.2 Etudes cliniques (72)*

## **Objectifs (75)**

## **Matériels et Méthodes (77)**

Animaux – (77)

Les anticorps – (78)

Immunisation passive – (78)

Préparations des extraits de cerveaux Alzheimer – (80)

Fibrilles P301L-K18 – (80)

Injections stéréotaxiques – (81)

Préparation des tissus, immunohistochimie, immunofluorescence et quantification – (82)

- *Préparation des tissus (82)*
- *Immunohistochimie (83)*
- *Immunofluorescence (84)*
- *Quantification (84)*

Extraction des protéines tau insolubles au sarkosyl – (85)

Analyse par Western blot – (86)

Analyse statistique – (86)

Modèle d'agrégation de protéines tau recombinantes in vitro – (86)

Microscopie électronique – (87)

## **Résultats (88)**

### **CHAPITRE 1 : Modèle de nucléation (88)**

- I. Un homogénat de cerveau humain issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer est en mesure d'induire la nucléation et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires au départ de protéines tau humaines mutées, exprimées dans le cerveau de jeunes souris Tg30tau (88)
- II. L'immunisation passive au départ d'un anticorps dirigé contre la partie médiane de la protéine tau réduit plus fortement l'apparition de la tauopathie dans le modèle de nucléation qu'un anticorps d'épitope N-terminal (92)

*II.1 Caractérisation des anticorps anti-tau (92)*

*II.2 Traitements immunothérapeutiques au départ des anticorps A et D dans le modèle de nucléation (95)*

### **CHAPITRE 2 : Modèle de propagation (103)**

- I. Les fibrilles P301L-K18 sont en mesure d'induire le recrutement et nucléation de protéines tau humaines mutées, exprimées dans le cerveau de jeunes souris htauP301L (103)
- II. L'immunisation passive au départ de l'anticorps D est en mesure de prévenir la propagation d'espèces pathologiques composées de protéines tau humaines (106)

## **Discussion (109)**

- I. Modèle de nucléation (111)
- II. Modèle de propagation (113)
- III. Mécanismes d'action de l'anticorps D (115)
- IV. Espèces toxiques de tau responsables de la propagation (117)

## **Bibliographie (125)**



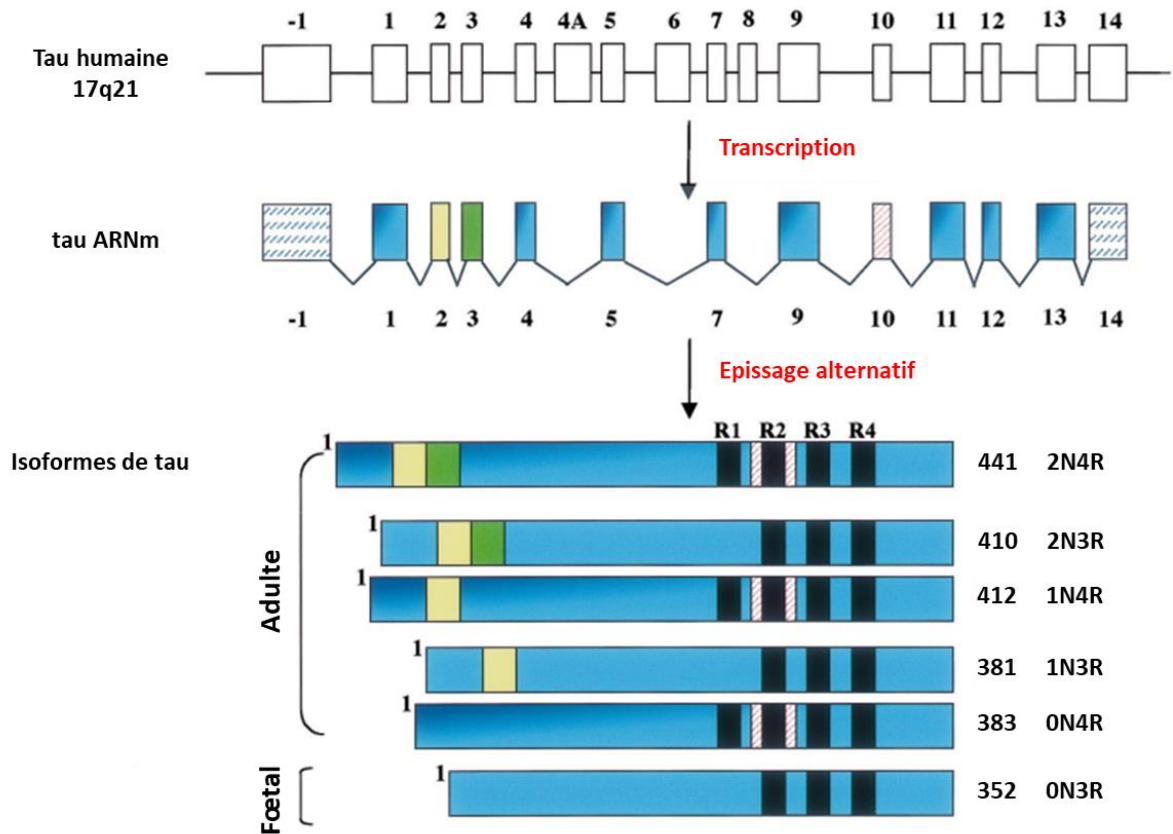
# Introduction

## **CHAPITRE 1 : La protéine tau : généralités**

C'est en 1975 que la protéine tau fut découverte et définie comme l'une des premières protéines associées aux microtubules (MAPs, 'microtubule-associated proteins') (Weingarten et al. 1975). Notamment exprimée dans le cerveau, la protéine tau se situe principalement au niveau des axones neuronaux et a pour fonction primaire, la régulation de la dynamique des microtubules, ainsi que le maintien de leur position dans l'espace. De ce fait, la protéine tau se trouve impliquée dans l'architecture neuronale et le transport axonal.

### **I. Du gène aux isoformes**

Chez l'homme, le gène de la protéine tau contient 16 exons et se situe sur le chromosome 17 au niveau du locus q21 (Neve et al. 1986). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 représentent les exons codants composant systématiquement le transcrit primaire (ARNm de tau). Lors de l'épissage alternatif, les exons 2, 3 et 10 peuvent être épissés, ce qui explique les 6 isoformes humains de la protéine tau allant de 352 à 441 acides aminés. (Figure 1)



**Figure 1 : Représentation du gène humain de la protéine tau, son transcrit primaire et les six isoformes qui lui sont associés.** Le gène de la protéine tau contient 16 exons et se situe sur le bras long du chromosome 17 au locus q21. Chez l'homme, les exons 4A, 6 et 8 ne sont pas transcrits, contrairement aux exons -1 et 14 qui composeront le transcrit primaire mais ne seront pas repris lors de l'étape de traduction. De ce fait, l'ARNm de la protéine tau compte 13 exons. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont des exons constitutifs tandis que les exons 2, 3 et 10 peuvent subir un épissage alternatif. L'exon 3 requérant systématiquement l'inclusion de l'exon 2, l'épissage aboutit à une exclusion d'insert (0N), un insert (1N ; exon 2) ou deux inserts (2N ; exons 2 & 3) en l'extrémité N-terminale. L'épissage de l'exon 10 résulte quant à lui, en la présence de trois (3R : R1, R3 & R4) ou quatre (4R : R1, R2, R3 & R4) domaines de liaison aux microtubules, formant ainsi les 6 isoformes de la protéine tau retrouvés chez l'homme, allant de 352 à 441 acides aminés. Modifié de (Buée et al. 2000).

Au niveau N-terminal, l'exon 2 peut apparaître seul, contrairement à l'exon 3 qui requiert systématiquement l'inclusion de l'exon 2. L'épissage aboutit donc à une exclusion d'insert (0N), un insert (1N ; exon 2) ou deux inserts (2N ; exons 2 & 3) au niveau de l'extrémité N-terminale (Goedert et al. 1989). L'épissage de l'exon 10 aboutit quant à lui à la présence de trois (3R : R1, R3 & R4) ou quatre (4R : R1, R2, R3 & R4) domaines de liaison aux microtubules (MTBR, 'microtubule-binding repeat domains'). En raison de ce domaine de liaison supplémentaire, les isoformes 4R de tau se lient avec plus d'affinité aux fibres de tubuline.

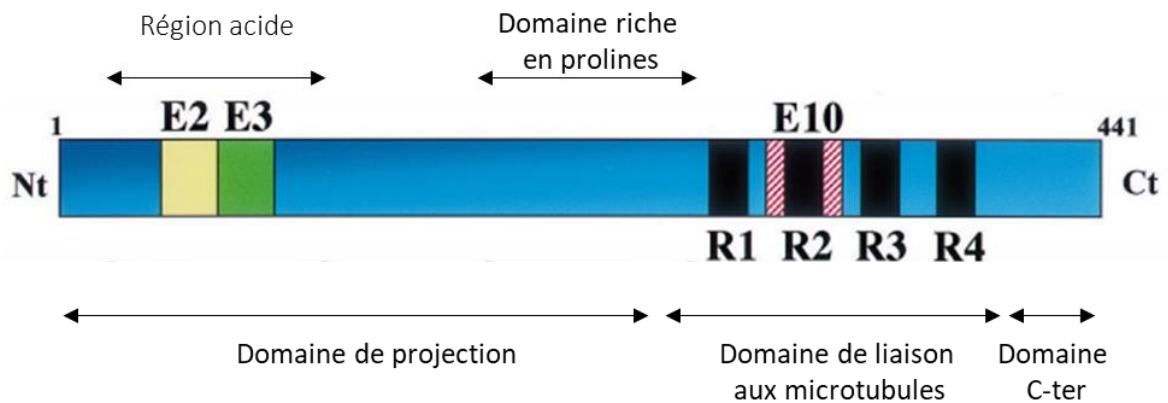
Dans le cerveau embryonnaire, seul l'isoforme ON3R est exprimé. Au cours du développement cérébral, les différents isoformes de la protéine tau seront ensuite exprimés jusqu'à atteindre un ratio équimolaire des formes 3R et 4R dans le cerveau adulte. Dans certaines pathologies impliquant directement la protéine tau comme la paralysie supranucléaire progressive (PSP) ou la maladie de Pick (PiD), une modification de l'épissage de l'exon 10 aboutit à une élévation (PSP) ou diminution (PiD) significative du ratio des isoformes 4R/3R de la protéine tau (Sergeant et al. 1997; Sergeant, Watzel, and Delacourte 1999). Dans la maladie d'Alzheimer, les patients semblent également présenter un taux anormalement élevé d'ARNm incluant l'exon 10. Comprendre l'origine et l'effet de ce déséquilibre en faveur des isoformes 3R ou 4R pourrait mettre en avant des pistes thérapeutiques intéressantes, en vue de traiter ces maladies incurables (F. Liu and Gong 2008).

## **II. Structure et domaines de la protéine**

En raison de son caractère hydrophile, sous sa forme physiologique, la protéine tau n'adopte pas la structure repliée et compacte caractéristique de la plupart des protéines cytosoliques. Diverses méthodes biophysiques (dichroïsme circulaire, RMN et diffusion de rayons X à petits angles) l'ont définie comme une protéine «dépliée nativement» ou «intrinsèquement désordonnée» (Schweers et al. 1994; Mukrasch et al. 2009). La chaîne polypeptidique de tau présente des structures secondaires peu nombreuses et transitoires (hélice  $\alpha$ , brin  $\beta$ , hélice poly-proline II) qui expliquent son caractère hautement flexible et mobile.

La protéine tau se définit par 4 régions : une région dite de projection à l'extrémité N-terminale, un domaine central riche en prolines, un domaine de liaison aux microtubules et enfin, une région carboxy-terminale. (Figure 2)





**Figure 2 : Représentation des domaines fonctionnels de l'isoforme 2N4R de la protéine tau.** Le domaine de projection N-terminal, présentant une région acide, se projette à la surface des microtubules et régule leur position dans l'espace. Le domaine riche en prolines (Pro) présente d'abondants sites de phosphorylation (Ser-Pro ou Thr-Pro) et jusqu'à sept motifs « Pro-X-X-Pro » permettant une interaction avec les protéines comportant le domaine Src homology 3 (SH3). Le domaine de liaison aux microtubules et la quarantaine de résidus qui le précède permettent à la protéine tau d'interagir avec les fibres de tubuline et assurer leur stabilisation. Enfin, le domaine C-terminal, globalement neutre, contenant également d'abondants motifs « Ser-Pro » et « Thr-Pro », semble être impliqué dans des interactions de faible ampleur avec les microtubules. Modifié de (Buée et al. 2000).

Le domaine N-terminal, essentiellement acide, projette à la surface des microtubules. Il serait à la fois en mesure de s'associer à la membrane cellulaire et d'interagir avec d'autres éléments du cytosquelette afin de réguler la position des microtubules dans l'espace (Hirokawa, Shiomura, and Okabe 1988).

Le domaine riche en prolines (Pro) présente d'abondants sites de phosphorylation (Ser-Pro ou Thr-Pro) et jusqu'à sept motifs « Pro-X-X-Pro » permettant une interaction avec des protéines comportant le domaine Src homology 3 (SH3), telle la tyrosine kinase Fyn (L. M. Ittner et al. 2010).

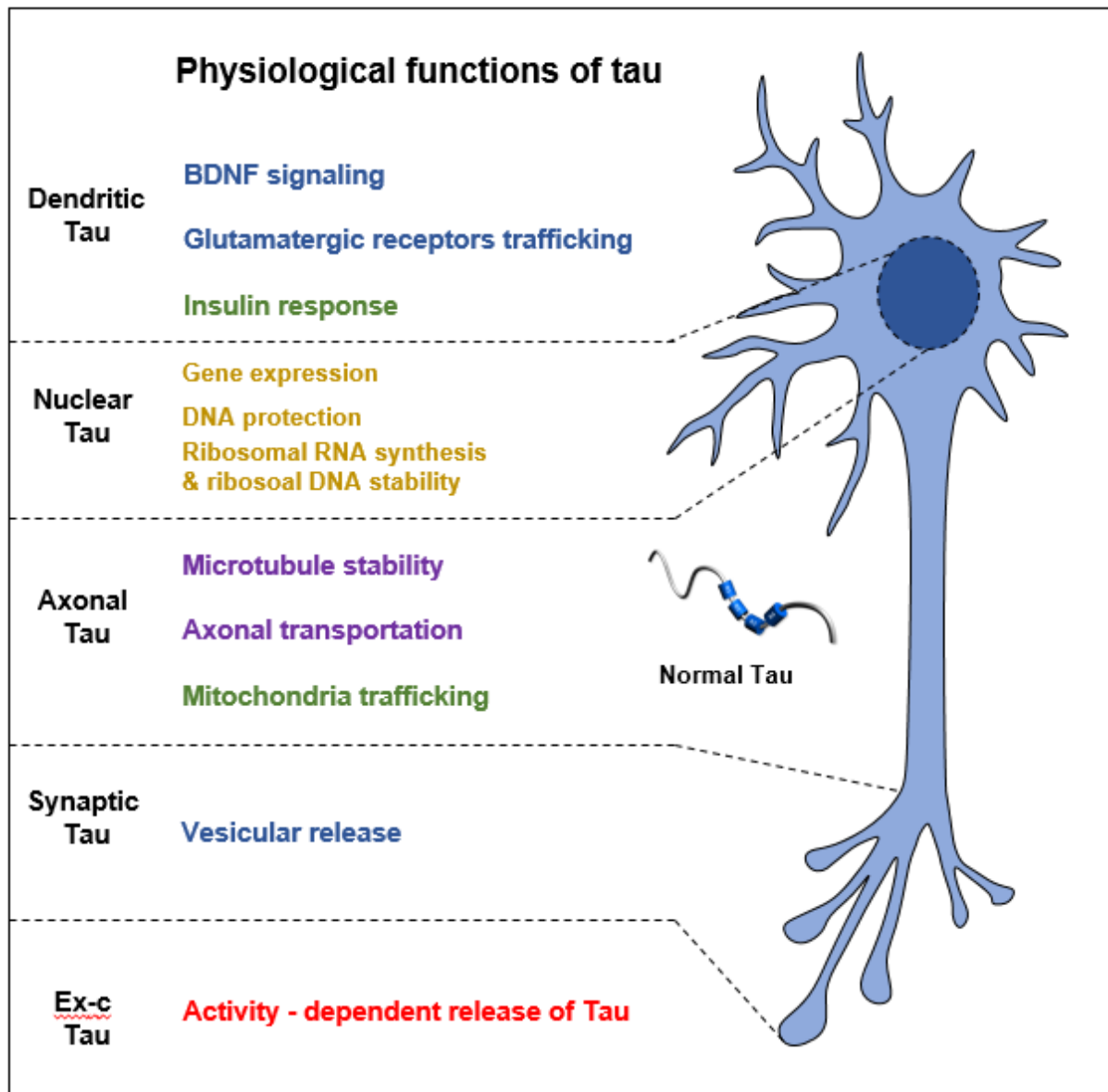
Comme son nom l'indique, le domaine de liaison aux microtubules ainsi que la quarantaine de résidus qui le précède (Mukrasch et al. 2005; Sillen et al. 2007) permettent à la protéine tau d'interagir avec les fibres de tubuline, assurant ainsi leur stabilisation (Steiner et al. 1990).

Enfin, le domaine C-terminal, globalement neutre, contient également de nombreux sites « Ser-Pro » et « Thr-Pro » sujets à la phosphorylation. Il pourrait être impliqué dans des interactions de faible ampleur avec les microtubules (Mukrasch et al. 2009)

Dans les tauopathies, pathologies relatives à la protéine tau, une perte de la structure intrinsèquement désordonnée de la protéine sera observée, au profit d'une agrégation pathologique, aboutissant à la perte des fonctions physiologiques de la protéine.

### III. Fonctions physiologiques de la protéine tau

En condition physiologique, la protéine tau est associée à de nombreuses fonctions. (Figure 3). Au sein des axones, la protéine participe au maintien de l'architecture neuronale, de par son association et son rôle de stabilisateur des microtubules (Himmler et al., 1989). Ainsi, la protéine tau permet le maintien d'un transport axonal fonctionnel, essentiel à l'activité synaptique.



**Functions : Synaptic – Nuclear – Metabolism – Transport - Spreading**

**Figure 3 : Fonctions physiologiques associées à la protéine tau.** En plus de stabiliser les microtubules et assurer ainsi le transport axonal, la protéine tau est impliquée dans l'activité synaptique (voies de signalisation du BDNF, des récepteurs glutamatergiques, libération vésiculaire), la stabilité nucléaire (régulation de l'expression génique, protection de l'ADN, synthèse de l'ARN ribosomal et stabilité de l'ADN ribosomal) et le métabolisme (implication dans les réponses à l'insuline ou transport mitochondrial). Enfin, des fonctions inconnues à ce jour existent probablement en regard des protéines tau extracellulaires.

Bien que majoritairement cytosolique, la protéine tau peut également être retrouvée dans le noyau, sous une forme essentiellement non-phosphorylée (Loomis et al. 1990; Metzals et al. 1988; T. Guo, Noble, and Hanger 2017). Dans ce compartiment cellulaire, la protéine tau serait impliquée dans la synthèse des ARN ribosomaux et la stabilité de l'ADN ribosomal (Bou Samra et al. 2017) . En condition de stress, la protéine tau aurait également un rôle protecteur envers l'ARN et l'ADN. En effet, lors d'un stress thermique ou oxydatif, la protéine tau se fixe aux acides nucléiques et les protège d'éventuels dommages (Sultan et al. 2011; Violet et al. 2014). La protéine tau est aussi en mesure de fixer et d'inhiber l'activité de HDAC6, une histone désacétylase notamment impliquée dans la désacétylation de la tubuline (Perez et al. 2009). Ce type d'interaction dans le compartiment nucléaire permettrait indirectement à la protéine tau de moduler l'expression de certains gènes. Cette capacité à moduler l'expression génique pourrait également être à action directe, de par la liaison protectrice de la protéine tau à l'hétérochromatine péricentromérique dont l'intégrité est atteinte chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer (Mansuroglu et al. 2016).

Bien qu'il sera montré dans le prochain chapitre, que la plupart des fonctions associées à la protéine tau sont inhibées ou diminuées par l'addition de groupements phosphates, la phosphorylation au niveau du résidu sérine 396 semble cruciale pour l'induction de la dépression à long terme (LTD) ; un processus critique pour la mémorisation (Regan et al. 2015; Tetsuya Kimura et al. 2014). L'implication de la protéine tau dans ce processus est confirmée par une étude montrant que son absence s'oppose à l'induction de la dépression à long terme habituellement observée en présence d'insuline. (Marciniak et al. 2017) Ceci est également valable pour la phosphorylation des résidus Ser262 et Ser356 (KXGS motifs) qui, bien qu'associée à une perte de la fonction de la protéine tau au sein des microtubules, est nécessaire à la formation de prolongements neuronaux (Jacek Biernat and Mandelkow 1999; Jacek Biernat et al. 2002).

Enfin, la protéine tau semble également impliquée dans des voies de signalisation synaptiques. En effet, cette dernière a été décrite comme un médiateur indispensable entre la kinase Fyn et un de ses substrats, les récepteurs NMDA (L. M. Ittner et al. 2010), favorisant ainsi la plasticité synaptique et la mémorisation (L. M. Ittner et al. 2010; Mondragón-Rodríguez et al. 2012). La protéine tau semble également impliquée dans la voie de signalisation du BDNF ('Brain-Derived Neurotrophic Factor'), facteur neurotrophique majeur du SNC (Q. Chen et al. 2012; Burnouf et al. 2013; Jiao et al. 2016).

## **CHAPITRE 2 : Phosphorylation de la protéine tau**

### **I. Phosphorylation physiologique.**

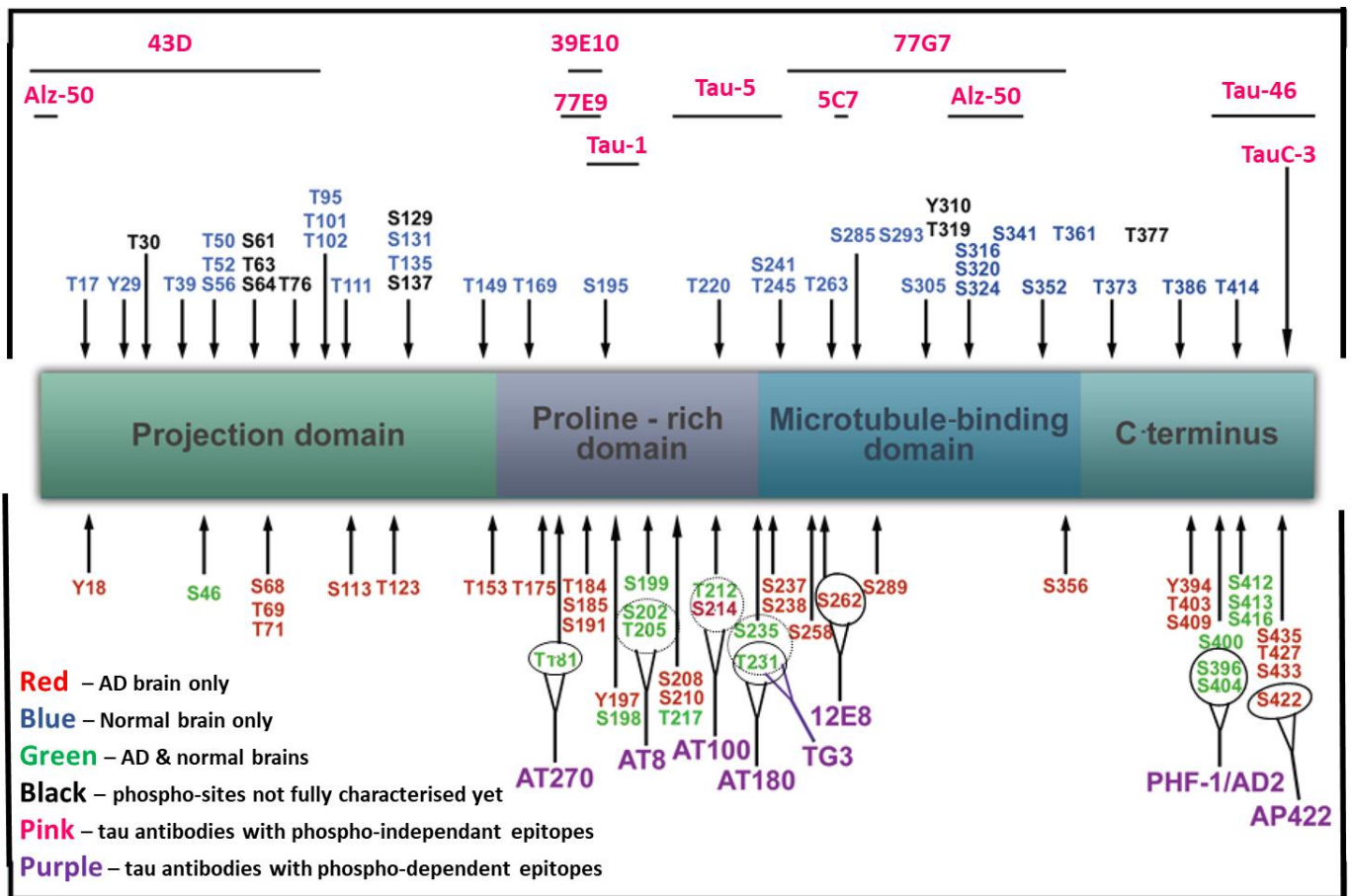
La plus longue isoforme de la protéine tau (2N4R, 441 acides aminés) comprend 80 résidus sérine ou thréonine ainsi que 5 résidus tyrosine ce qui constituent pas moins de 85 sites de phosphorylation potentiels (Hasegawa et al. 1992). La phosphorylation est la modification post-traductionnelle physiologique la plus utilisée par les cellules afin de réguler les fonctions de la protéine tau (Johnson and Stoothoff 2004)

Dans certains cas, les cellules ont recours à une hyperphosphorylation transitoire de la protéine tau en vue de réguler négativement son activité. C'est le cas dans le cerveau fœtal où une hyperphosphorylation temporaire de la protéine tau est observée en vue de contrôler la croissance des prolongements neuronaux et permettre un bon développement cérébral (Goedert et al. 1993; Brion et al. 1993; Kenessey and Yen 1993). Une hyperphosphorylation physiologique réversible est également observée chez les animaux lors de l'hibernation. Celle-ci s'explique probablement par une réduction de l'activité des phosphatases en cas d'hypothermie (Planel et al. 2004; Run et al. 2009).

### **II. Hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau dans les tauopathies**

Les tauopathies sont caractérisées par une hyperphosphorylation anormale pathologique de la protéine tau. Dans le cerveau des patients souffrant de ces pathologies, la protéine tau hyperphosphorylée s'agrège et s'accumule dans les corps cellulaires sous forme d'enchevêtrements neurofibrillaires qui, à long terme, induisent la mort cellulaire (H Braak et al. 1986). La pathogenèse ainsi que l'ensemble des maladies neurodégénératives liées à la protéine tau, vous seront présentés dans les prochains chapitres. Pour le moment, nous retiendrons que la tauopathie la plus fréquente et la plus étudiée n'est autre que la maladie d'Alzheimer. Chez les patients atteints de la démence Alzheimer, on retrouve 6 à 8 moles de phosphate par mole de protéine tau, ce qui représente une phosphorylation 3 à 4 fois plus importante que ce qui est observé chez les sujets sains (J.-Z. Wang et al. 2012). Sur les 85 sites de phosphorylation potentiels, dans les enchevêtrements neurofibrillaires, au moins 39 résidus sérines et thréonines (Hanger et al. 2007) et 2 résidus tyrosines (G. Lee et al. 2004) seraient phosphorylés. Selon le site de phosphorylation, on distingue des épitopes étant naturellement phosphorylés chez les sujets sains, des épitopes uniquement phosphorylés en condition pathologique (maladie d'Alzheimer) ou encore, des épitopes potentiellement phosphorylés chez les sujets sains et systématiquement phosphorylés en condition pathologique. (Figure 4)

## Tau epitopes phosphorylated in the normal brain



## Tau epitopes phosphorylated in the AD brain

**Figure 4 : Sites de phosphorylation et épitopes des anticorps principaux, reconnus pour cibler la protéine tau.** Les sites de phosphorylation uniquement retrouvés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont associés à la couleur rouge. Tandis que les sites de phosphorylation, présents exclusivement chez les sujets sains, sont annotés en bleu. Enfin, la couleur verte est associée aux sites phosphorylés retrouvés à la fois chez les sujets sains et les patients Alzheimer. La couleur noire reprend les sites qui, à ce jour, n'ont pas encore été suffisamment caractérisés pour être attribués à l'une de ces catégories. Les anticorps ciblant la protéine tau sur base d'un épitope phospho-dépendant sont annotés en mauve. Tandis que le reste des anticorps, présentant des épitopes non-phosphorylés, sont associés à la couleur rose. Modifié de (Šimić et al. 2016).

Sur base de la figure 4, au sein des anticorps phospho-dépendants, seulement 3 anticorps (AT100, 12E8, AP422) ciblent spécifiquement des sites de phosphorylation pathologiques propres à la maladie d'Alzheimer (pSer214, pSer262, pSer422). Dans la littérature, les anticorps les plus utilisés en vue de quantifier les formes hyperphosphorylées de tau sont les anticorps AT8 (Ser202, Thr205 et Ser208) et PHF-1 (pSer396, pSer404). Pour une quantification des formes exclusivement pathologiques, un anticorps ciblant la pSer422 peut être utilisé. Concernant les formes agrégées et/ou fibrillaires, seul l'anticorps AT100 (Thr212, Ser214) semble réellement spécifique (Allen et al. 2002; Augustinack et al. 2002). Dans ce travail de thèse, nous avons évalué par immunohistochimie la présence de protéines

tau pathologiques départ des anticorps AT8 et AT100 afin de quantifier à la fois les espèces hyperphosphorylées et agrégées de tau dans nos modèles in vivo.

Actuellement la confirmation diagnostique de la maladie Alzheimer ne peut être établie qu'après la mort du patient, suite à une étude de l'immunoréactivité cérébrale à l'anticorps AT8. Malheureusement, peu d'outils diagnostiques sont disponibles aujourd'hui pour détecter précocement cette démence. Parmi les outils disponibles, se distinguent les dosages au sein du liquide céphalo-rachidien (LCR) (Blennow 2017), des peptides amyloïde  $\beta$ 42, des protéines tau totales et des protéines tau phosphorylées aux résidus thréonine 231 (p-tau<sub>231</sub>) (Hansson et al. 2006), sérine 199 (p-tau<sub>199</sub>) (Itoh et al. 2001) et thréonine 181 (p-tau<sub>181</sub>) (Lewczuk et al. 2004). Il semblerait que le dosage des formes phosphorylées de tau reflète mieux la pathologie de par une grande spécificité et sensibilité (Babić et al. 2014).

### *II.1 Enzymes responsables de l'hyperphosphorylation de la protéine tau*

Dans la plupart des cas, l'hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau dérive d'un déséquilibre dans l'activité de kinases et de phosphatases, aboutissant à une dérégulation et augmentation de la phosphorylation, ainsi qu'à une diminution de la déphosphorylation (J.-Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 2007). De ce fait, les kinases et phosphatases impliquées dans l'hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau seraient également celles qui régulent la phosphorylation physiologique (Chong et al. 2018).

### II.1.1 Implication des kinases

La phosphorylation de tau serait assurée par des PDPKs ('proline-directed protein kinases') telles la CDK5 ('cyclin-dependant kinase 5') (Baumann et al. 1993) et la MAP kinase ('mitogen-activated protein') pouvant phosphoryler les résidus sérine ou thréonine lorsqu'ils précèdent un résidu proline (Ser-Pro, Thr-Pro). Des kinases phosphorylant uniquement les résidus Thr-Pro semblent également impliquées comme la PKA ('cyclic AMP-dependant protein kinase') (G A Jicha et al. 1999), MARK ('microtubule associated regulatory kinase') (Drewes et al. 1997), les caséines kinases I et II et enfin la CaMKII ('calmoduline-dependent protein kinase II') (Baudier and Cole 1987). La protéine kinase Fyn (src family) dont l'activité est dérégulée et augmentée dans la maladie d'Alzheimer semble également impliquée dans l'hyperphosphorylation de tau, notamment au niveau du résidu tyrosine 18 (Shirazi and Wood 1993; G. Lee et al. 2004) Pour finir, la kinase GSK-3 $\beta$  ('glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ') étant la seule kinase capable de phosphoryler les sites de phosphorylation n'incluant pas le résidu proline semble avoir un rôle très important dans la pathogenèse des tauopathies (Hanger et al. 1992).

Certains résidus peuvent être majoritairement phosphorylés par une kinase en particulier et bien souvent, ces modifications post-traductionnelles dépendent de phosphorylations successives assurées par plusieurs kinases (Taeko Kimura et al. 2018). L'hyperphosphorylation de tau ne serait donc pas un procédé aléatoire mais le résultat d'un travail coordonné des différentes kinases régulant la phosphorylation (Zheng-Fischhöfer et al. 1998; Gregory A. Jicha et al. 1999).

Par exemple, il semblerait que la Ser396 soit phosphorylée suite à la pré-phosphorylation du résidu Ser400 (Li and Paudel 2006). De la même manière, une phosphorylation efficace du résidu Thr231 demanderait une pré-phosphorylation du résidu Ser235 (Goedert et al. 1994; J.-H. Cho and Johnson 2004) Enfin, une phosphorylation consécutive est également observée au sein des résidus Ser404, Ser235 et Thr205 (Taeko Kimura et al. 2016).

Nuak1, kinase AMPK-dépendante, phosphoryle la protéine tau sur le résidu Ser356 et semble être impliquée quand l'initiation de la cascade d'hyperphosphorylation de la protéine tau (Cristian A. Lasagna-Reeves et al. 2016). Associée à la phosphorylation du résidu Ser262, cette phosphorylation pSer356 permet le détachement physiologique de la protéine tau des microtubules, ce qui régule la dynamique d'activité de la protéine au sein des microtubules (Biernat & Mandelkow, 1999). Cependant, il a également été montré que la phosphorylation du résidu Ser356 était requise pour initier l'hyperphosphorylation en divers résidus par d'autres kinases associées à l'hyperphosphorylation et agrégation de tau (Nishimura, Yang, and Lu 2004). Impliquée dans la maladie d'Alzheimer et la PSP, l'activité de Nuak1 pourrait induire une cascade évènementielle aboutissant à une augmentation de la stabilité de tau, favorisant son accumulation puis agrégation et formation de

DNFs. Réduire de 50% l'activité de cette kinase Nuak1 permet une diminution directe de la quantité de protéines tau totales et prévient l'apparition des déficits associés à un modèle transgénique murin de tauopathie (Cristian A. Lasagna-Reeves et al. 2016).

Malgré l'implication des kinases dans l'hyperphosphorylation de tau, l'inhibition de la GSK-3 $\beta$  par le composé tideglusib n'a pas montré d'efficacité chez l'homme, en essai clinique phase 2 (Lovestone et al. 2015). Selon ces résultats, inhiber la phosphorylation de tau ne serait pas suffisant pour empêcher la progression clinique de la maladie d'Alzheimer.

### II.1.2 Implication des phosphatases

En plus d'une augmentation de l'activité des kinases impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau, l'hyperphosphorylation pathologique serait associée à un défaut d'activité de phosphatases. En effet, dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'activité des phosphatases est réduite d'environ 20% dans la matière grise contre 40% dans la substance blanche (Gong et al. 1993). La phosphatase la plus active (70%) dans la régulation de la phosphorylation de tau est PP2A ('phosphoseryl/phosphothreonyl protein phosphatase-2A') (J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996; F. Liu et al. 2005).

Il a été montré que le niveau d'activité de l'asparaginyl endopeptidase, capable d'induire l'activation du second inhibiteur de PP2A (I2<sup>PP2A</sup>) était significativement augmenté chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ce qui pourrait expliquer l'activité limitée de cette phosphatase (Basurto-Islas et al. 2013). De plus, il semblerait également que le niveau d'expression d'ARN messenger des deux inhibiteurs de PP2A (I1<sup>PP2A</sup> et I2<sup>PP2A</sup>) soit significativement plus élevé chez ces patients ce qui expliquerait de manière similaire l'augmentation de la phosphorylation de tau (Tanimukai, Grundke-Iqbal, and Iqbal 2005; S. Chen et al. 2008).

Pour finir, il semblerait que l'activation de la kinase GSK-3 $\beta$  serait associée à une inhibition de l'activité de la phosphatase-2A (PP2A) (Yao et al. 2011; F. Liu and Gong 2008). Les kinases et les phosphatases pourraient, de ce fait, avoir un effet complémentaire et synergique dans l'hyperphosphorylation de tau, ce qui complexifie l'élaboration de traitements éventuels ciblant les enzymes régulant la phosphorylation.



### **III. Conséquences liées à l'hyperphosphorylation de la protéine tau**

Dans ce chapitre, les conséquences liées à l'hyperphosphorylation pathologique des protéines tau, seront, dans un premier temps, détaillées point par point avant d'être reprises et résumées de façon synthétique dans la figure 5 (Johnson and Stoothoff 2004).

#### **III.1 Perte des fonctions physiologiques de la protéine tau**

La capacité de tau à promouvoir l'assemblage et la stabilisation des microtubules dépend de son degré de phosphorylation (Lindwall and Cole 1984). En cas d'hyperphosphorylation, une perte de la fonction de tau au sein des microtubules est observée. En effet, *in vitro*, la phosphorylation au niveau des résidus Thr231 (J.-H. Cho and Johnson 2003, 2004), Ser262 (J Biernat et al. 1993) et Ser356 réduit l'affinité de la protéine tau pour la tubuline, au point de provoquer son détachement des microtubules. La phosphorylation du domaine riche en proline et de la région C-terminale diminue d'environ 70% l'activité de la protéine tau au sein des microtubules, ce qui est insuffisant pour assurer leur stabilité et induit leur désorganisation (F. Liu et al. 2007; J. H. Cho and Johnson 2003).

L'hyperphosphorylation de la protéine tau suite à l'inhibition de la déphosphorylation par la phosphatase PP2A (Yang et al. 2007) ou une augmentation de l'activité de la GSK3 kinase (Sayas, Avila, and Wandosell 2002) résulte en un déficit du transport axonal et une inhibition du développement des prolongements neuronaux, pouvant aboutir à une rétraction neuritique.

Sous sa forme hyperphosphorylée, la protéine tau, habituellement retrouvée dans les projections axonales, est rapatriée dans le compartiment somatodendritique où elle s'accumule jusqu'à former des agrégats intracellulaires qui interfèrent avec la transmission synaptique (Hoover et al. 2010).

## III.2 Agrégation et accumulation de protéines tau hyperphosphorylées

### III.2.1 Changement conformationnel

La phosphorylation contrôle également la conformation de la protéine tau. Luna Munoz et ses collaborateurs ont mis en évidence que la phosphorylation du résidu Thr231 induisait un changement conformationnel pathologique détectable par les anticorps TG-3 et Alz-50 (Luna-Muñoz et al. 2005, 2007).

Sous sa forme naturellement non structurée, la protéine tau adopte une conformation en forme de trombone où l'extrémité N-terminale et C-terminale se replie de sorte à s'approcher des domaines de répétitions (Sadasivam Jeganathan et al. 2006). La phosphorylation aux sites AT8 (Ser202, Thr205, Ser208) et PHF1 (Ser396/Ser404) va repousser les bras N-ter et C-ter induisant l'ouverture de cette structure en trombone (Jeganathan et al. 2008). Cette élongation de la protéine tau pourrait expliquer l'augmentation de la distance inter-microtubulaire suite à la phosphorylation des résidus reconnus par l'anticorps AT8 (Shahpasand et al. 2012).

### III.2.2 Agrégation

L'hyperphosphorylation de la protéine tau précède et favorise son agrégation et son assemblage en structures fibrillaires (F. Liu et al. 2007). En effet, *in vitro*, l'expression et la phosphorylation des 6 isoformes recombinant de tau suffisent à induire leur agrégation et la formation de filaments (A. d. C. Alonso et al. 2001; Khalid Iqbal, Liu, and Gong 2016; Ihara et al. 1986). *In vivo*, traiter des souris transgéniques tau-P301L avec un inhibiteur de la GSK3 kinase induit une diminution de la phosphorylation de tau qui résulte en une baisse significative des agrégats pathologiques (Pérez et al. 2003; Le Corre et al. 2006). De la même manière, la déphosphorylation des protéines tau hyperphosphorylées, isolées du cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer par la PP2A, dissocie les fibres, et restaure la capacité des protéines tau à promouvoir l'assemblage de la tubuline et la stabilisation des microtubules. Une phosphorylation de cette tau déphosphorylée fonctionnelle à l'aide de kinases (PKA, CaMKII puis GSK-3 $\beta$  ou CDK5 mais également CDK5 et GSK-3  $\beta$ ) résulte en un réassemblage et une formation de fibres semblables à celles initialement observées chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer. Une phosphorylation successive de protéines tau recombinantes avec ces mêmes kinases (PKA, CaMKII puis GSK-3 $\beta$  ou cdk5) aboutit également à l'apparition de structures fibrillaires.

Certains sites de phosphorylation sur les résidus Thr231 et Ser262, semblent requis pour observer l'agrégation pathologique des protéines tau (J.-Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 2007).

Selon la tauopathie, les fibres de tau se sont vues associées à un repliement et une structure tridimensionnelle distincte (Falcon et al. 2018; Fitzpatrick et al. 2017). Ces différences structurales expliquent l'apparition récente d'anticorps conformationnels, spécifiques des protéines tau pathologiques présentes chez les patients Alzheimer et incapables à reconnaître les protéines tau pathologiques retrouvées dans d'autres tauopathies (Gibbons et al. 2018).

### III.2.3 Inhibition de la dégradation par les protéases

L'ubiquitination via le protéasome et l'autophagie lysosomale sont les mécanismes cellulaires majeurs déployés en vue d'éliminer les protéines endommagées ou mal conformées au sein du cytoplasme.

L'hyperphosphorylation et l'agrégation de tau résultent en une diminution de la fonction d'autophagie et une résistance à la dégradation via le protéasome dont l'activité est déjà significativement réduite dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Keller, Hanni, and Markesbery 2000; Keck et al. 2003). Ceci explique la présence de protéines tau polyubiquitinylées au sein des enchevêtrements neurofibrillaires (Cripps et al. 2006; Mori, Kondo, and Ihara 1987). Le complexe HSP90 étant en mesure de lier et de stabiliser la protéine tau phosphorylée limiterait également sa dégradation (Dickey et al. 2007).

## III.3 Dégénérescence neurofibrillaire

### III.3.1 Inhibition de l'apoptose

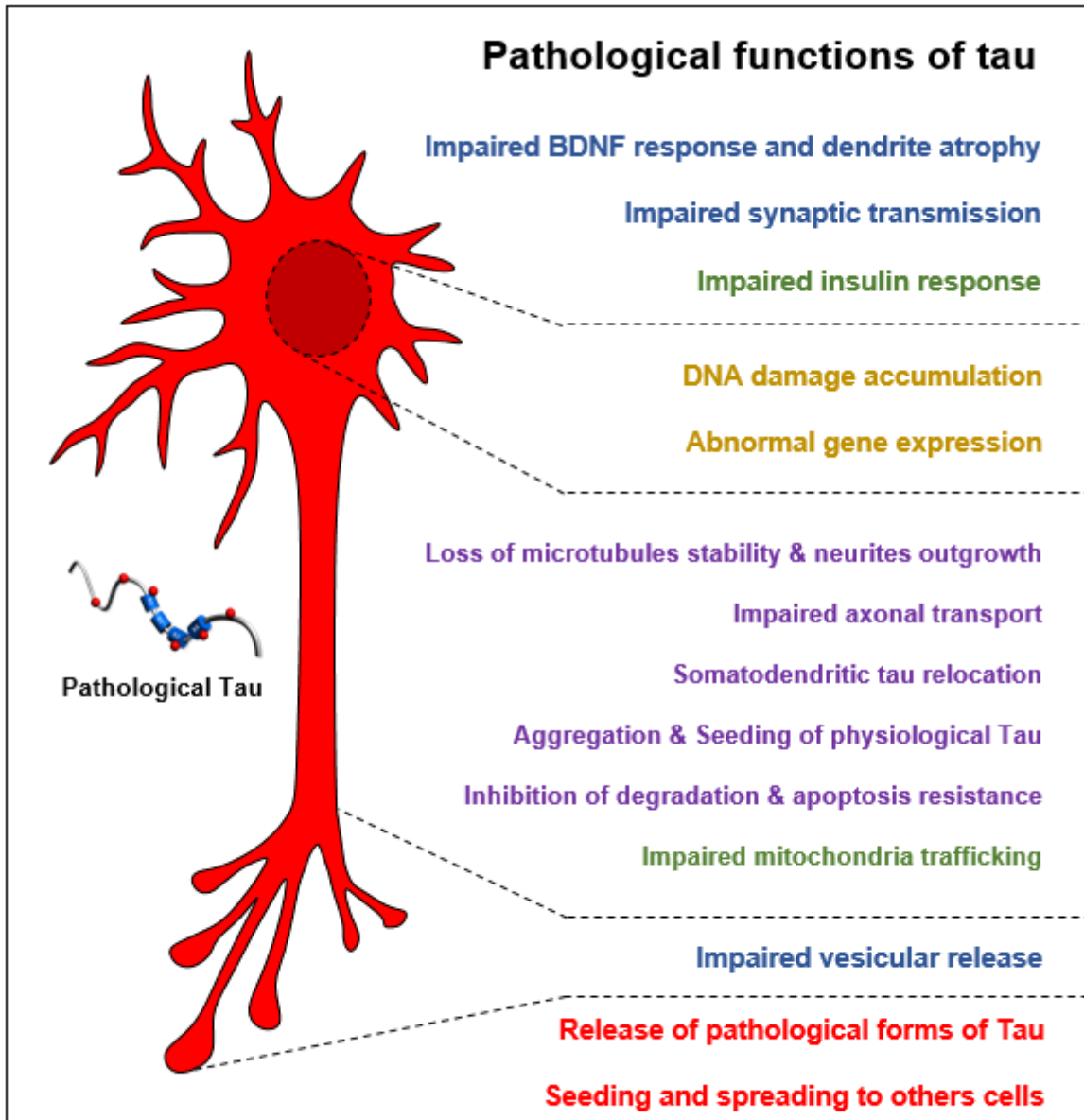
*In vitro*, la pseudo-phosphorylation de la protéine tau au niveau des résidus Thr212, Thr231, et Ser262 semble activer les voies de l'apoptose et être à l'origine d'une neurodégénérescence. Ceci suggère l'importance potentielle de la phosphorylation de ces sites dans la dégénérescence neurofibrillaire (A. D. Alonso et al. 2010).

Pourtant, *in vivo*, bien que les neurones des patients souffrant de la maladie d'Alzheimer soient constamment soumis à des signaux pro-apoptotiques (stress oxydatif, exposition au peptide amyloïde beta) (Raina et al. 2003; Hardy 2006), on observe peu de mort cellulaire par apoptose. Ceci suggère la présence, au sein des neurones malades, de mécanismes permettant d'échapper à l'apoptose. Selon plusieurs études, l'hyperphosphorylation de tau expliquerait cette résistance. En effet, en comparaison à la protéine tau hyperphosphorylée, les cellules exprimant une protéine tau déphosphorylée sont plus sujettes à l'apoptose (Rametti et al. 2004). De plus, la voie de signalisation Wnt est diminuée dans les

cellules en neurodégénérescence (Lucas et al. 2001; Caricasole et al. 2004). Enfin, l'hyperphosphorylation de la protéine tau diminuerait par compétition la phosphorylation de la protéine  $\beta$ -caténine, ce qui augmenterait potentiellement son activité et inhiberait les voies de l'apoptose (Raina et al. 2003; X.-A. Liu et al. 2010; H.-H. Wang et al. 2010). Malgré ces mécanismes d'évitement de l'apoptose, expliquant l'absence d'une mort neuronale rapide et massive chez les patients, les neurones accumulant la protéine tau hyperphosphorylée restent malades et ne sont plus en mesure d'assurer leurs fonctions physiologiques.

Des études vont jusqu'à affirmer que la formation des enchevêtrements fibrillaires serait neuroprotectrice (Andorfer et al. 2005; A. d. C. Alonso et al. 2006). Selon cette hypothèse, la formation des dégénérescences neurofibrillaires au départ de la protéine tau soluble hyperphosphorylée serait un mécanisme de défense déployé par les neurones, en vue de palier à la haute toxicité des formes solubles et anormalement phosphorylées de tau. Si elle se révèle exacte, cette hypothèse souligne le haut risque des traitements visant à empêcher l'agrégation ou à désagréger les enchevêtrements neurofibrillaires. Cependant, à ce jour, plusieurs études contredisent cette hypothèse, en démontrant le caractère toxique de l'agrégation intracellulaire de tau (Avila et al. 2006; Y. P. Wang et al. 2007; Khlistunova et al. 2006).

En résumé (figure 5), l'hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau aboutit à une incapacité d'assurer ses fonctions physiologiques, induit un changement conformationnel qui résulte en une agrégation et accumulation intracellulaire, expliquée par une résistance à la dégradation des formes agrégées et hyperphosphorylées de tau. Enfin, la présence intracellulaire de ces formes hyperphosphorylées pathologiques serait associée à des mécanismes d'échappements aux voies de l'apoptose. Néanmoins, l'accumulation croissante des enchevêtrements neurofibrillaires induirait in fine la mort cellulaire.



**Functions : Synaptic – Nuclear – Metabolism – Transport - Spreading**

**Figure 5 : Conséquences de l'hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau.** Sous sa forme hyperphosphorylée, la protéine tau n'est plus en mesure d'assurer la stabilisation des microtubules, ce qui a pour conséquences une perte de la croissance des prolongements neuronaux et une perturbation du transport axonal. L'hyperphosphorylation va également induire une relocalisation somatodendritique et une agrégation des protéines tau. Sous leur forme agrégée et hyperphosphorylée, les protéines tau pathologiques acquièrent des propriétés d'agent de nucléation et seraient en mesure de se propager de cellules à cellules pour transmettre, par simple contact, cet état pathologique aux protéines tau physiologiques. Ces formes hyperphosphorylées sont résistantes à la dégradation et semblent en mesure de prévenir l'apoptose. L'hyperphosphorylation empêche également la protéine tau d'assurer ses fonctions synaptiques (perturbation des voies de signalisation du BDNF, des récepteurs glutamatergiques et de la libération vésiculaire), nucléaires (accumulation de dommages à l'ADN et expression génique anormale) et métaboliques (perte de certaines réponses à l'insuline et perturbation du transport mitochondrial).

## CHAPITRE 3 : Tauopathies

Après avoir décrit en détails, les conséquences néfastes de l'hyperphosphorylation pathologique de la protéine tau, il est légitime d'étudier les pathologies humaines qui en découlent.

Comme expliqué précédemment, les tauopathies sont caractérisées par une neurodégénérescence progressive qui résulte de l'agrégation intra-neuronale de protéines tau anormalement- et hyperphosphorylées. En condition physiologique, un équilibre est observé entre les protéines tau liées aux microtubules et les protéines tau libres phosphorylées. En condition pathologique, une hyperphosphorylation anormale des protéines tau survient, ce qui induit un détachement des protéines tau des microtubules. Ces espèces hyperphosphorylées cytoplasmiques de tau vont alors s'agréger jusqu'à former des filaments hyperphosphorylés et insolubles. Selon les tauopathies, on distingue deux types de fibres : les filaments hélicoïdaux (PHFs for 'Paired Helical Filaments') et les filaments droits (SF for 'Straight Filament') (Crowther 1991). L'accroissement et l'accumulation intracellulaire progressives des filaments de tau au sein des neurones résulte en des enchevêtrement neurofibrillaires cytoplasmiques qui aboutiront à une dégénérescence neurofibrillaire (DNFs) et à la mort cellulaire (Cowan and Mudher, 2013). (Figure 6)

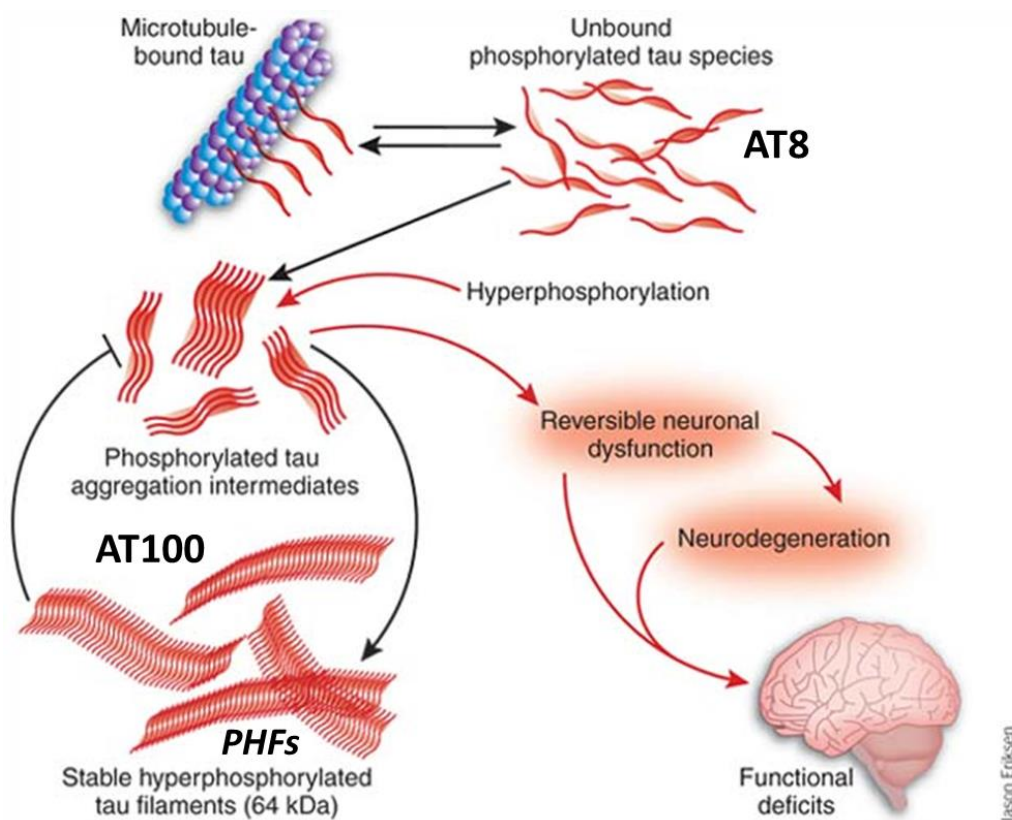


Figure 6 : Mécanismes sous-jacents aux tauopathies Modifié de (Duff and Planel 2005)

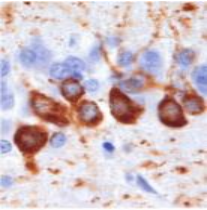
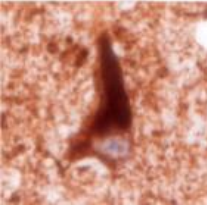
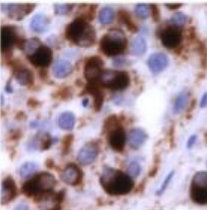
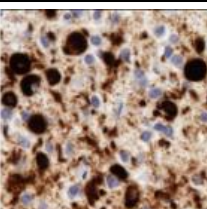
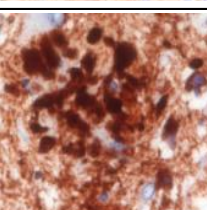
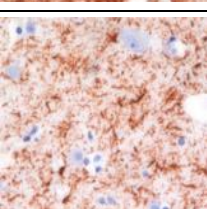
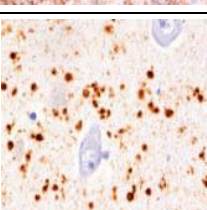
Les différentes tauopathies sont associées à des phénotypes neuropathologiques distincts se différenciant selon les symptômes, les régions anatomiques atteintes, la morphologie des lésions, la composition en isoformes et les types cellulaires impliqués (Kovacs 2015, 2017). Les tauopathies les plus étudiées consistent en la maladie de Pick (PiD), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale (CBD), la maladie à grains argyrophiles (AGD), la tauopathie gliale globulaire (GGT), les démences fronto-temporale ou parkinsonisme liées au chromosome 17 (FTDP-17), la maladie d'Alzheimer, l'encéphalopathie traumatique chronique (CTE) et enfin, la tauopathie primaire liée à l'âge (PART) ou démence-neurofibrillaire.

## **I. Lésions propres aux différentes tauopathies**

Bien que l'ensemble de ces tauopathies implique systématiquement des formes hyperphosphorylées de tau, une grande hétérogénéité est observée au sein des lésions. Elles varient selon le profil de phosphorylation, la morphologie, les types cellulaires atteints ou encore la composition en isoformes.

En vue de caractériser les différentes lésions, l'anticorps AT8, ciblant les protéines tau hyperphosphorylées sur les résidus pSer202, pThr205 et pSer208, a été utilisé pour visualiser les profils morphologiques lésionnels et les anticorps RD3/RD4 (spécifiques des formes 3R et 4R), pour définir l'implication des isoformes de la protéine tau (De Silva et al. 2003). Une coloration Gallyas (Uchihara 2007) et thioflavine-S positives (Groenning 2010), ciblant les structures fibrillaires en feuillets  $\beta$  plissés ont également été réalisées.

Au sein des neurones, les lésions de tau peuvent se présenter sous forme de pré-dégénérescences neurofibrillaires (pré-DNF), de dégénérescences neurofibrillaires, de corps de Pick, d'inclusions cytoplasmiques sphériques, de couronnes, de fibres tortueuses et enfin, de grains argyrophiles. (Figure 7)

Type cellulaire	Type de lésion	Immunoréactivité AT8	Description	4R	3R	Gallyas
<b>Neurones</b>	Pré-dégénérescences neurofibrillaires		Marquage granulaire fin et diffus du cytoplasme	+	-	-
	Dégénérescences neurofibrillaires		Structures fibrillaires cytoplasmiques	+	+ / -	+
	Corps de Pick		Structures fibrillaires cytoplasmiques de forme sphérique	-	+	-
	Inclusions cytoplasmiques sphériques		Structures ressemblant aux corps de Pick mais immunoréactivité 4R	+	-	+
	Couronnes		Marquage axonal dense au profil arrondi, ovale et allongé entourant les plaques amyloïdes	+ / -	+ / -	+
	Fibres tortueuses		Marquage fin au sein des prolongements neuronaux (axones)	+ / -	+ / -	+
	Grains argyrophiles		Marquage punctiforme (4-9 μm) dans le neuropile associé aux dendrites	+	-	+

**Figure 7 : Description et caractérisation immunohistochimique des lésions neuronales associées à l'accumulation de protéines tau pathologiques.** La caractérisation des lésions comprend une visualisation du profil d'immunoréactivité AT8, la composition en isoformes 3R/4R et la positivité au marquage Gallyas. Modifié de (Kovacs 2015)

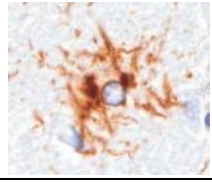
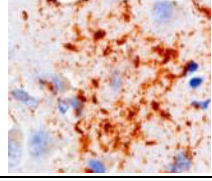
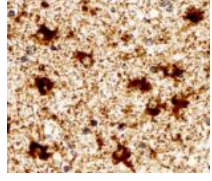
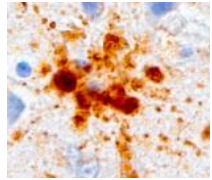
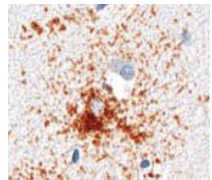
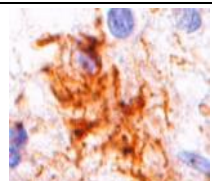


Les neurones ne sont pas les seuls types cellulaires affectés dans les tauopathies. Dans certains cas, les cellules gliales astrocytes (Figure 8) et oligodendrocytes (Figure 9), présentent également diverses lésions et profils de phosphorylation (Isidre Ferrer et al. 2014).

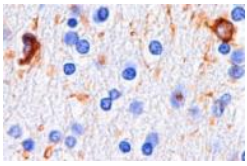
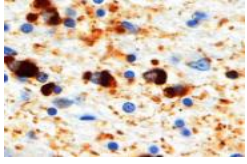
Dans les astrocytes, la protéine tau pathologique se présente principalement sous forme de touffes gliales/astrocytaires (PSP) ou de plaques gliales/astrocytaires (CBD). Des astrocytes épineux et des inclusions astrogliales globulaires (GAI) peuvent être également observées (Ahmed et al. 2011, 2013). Une immuno-positivité granulaire fine non argyrophile de tau peut également être observée le long des prolongements astrocytaires ('astrocytes bush-like' dans l'AGD) ce qui traduit probablement la présence de protéines tau hyperphosphorylées pré-agrégatives (Botez et al. 1999; Kovacs et al. 2011; Santpere and Ferrer 2009). Enfin, le terme astrocytes ramifiés, se réfère à des cellules aux noyaux excentriques présentant des prolongements argyrophiles épais et ramifiés retrouvés exclusivement dans la maladie de Pick. (Figure 8)

Au sein des oligodendrocytes, les lésions de tau se présentent sous forme de corps bobinés ou d'inclusions oligodendrogiales globulaires (GOI) (Ahmed et al. 2011, 2013). Ces inclusions peuvent mesurer jusqu'à 15  $\mu\text{m}$  de diamètre et sont caractéristiques des GGT. Certaines des inclusions oligodendrogiales globulaires affichent un aspect multiglobulaire. (Figure 9)

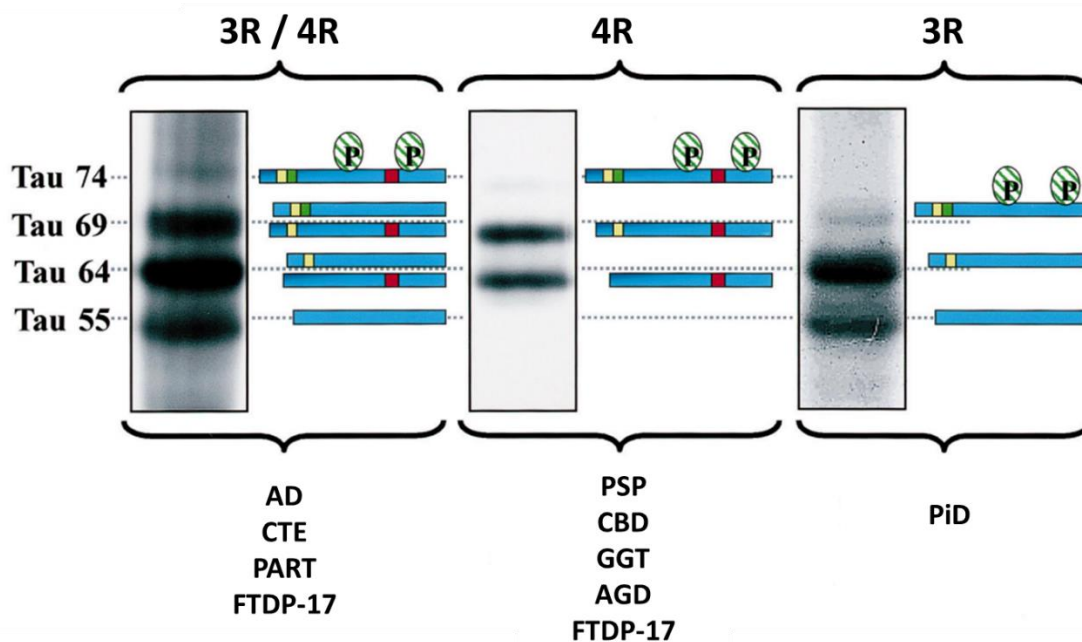
Selon la composition en isoforme des lésions, les formes pathologiques de la protéine tau peuvent adopter trois profils biochimiques distincts. (Figure 10) Les tauopathies impliquant à la fois des formes 3R et 4R présentent des bandes principales à 55, 64 et 69 kDa (démence Alzheimer, CTE, PART et FTDP-17). Les tauopathies impliquant majoritairement des formes 3R présentent des bandes à 55 et 64 kDa (PiD et FTDP-17). Enfin, les tauopathies (PSP, CBD, AGD, GGT et FTDP-17), à prédominance 4R, affichent des bandes à 64 et 69 kDa (Buée et al. 2000).

Type cellulaire	Type de lésion	Immunoréactivité AT8	Description	4R	3R	Gallyas
Astrocytes	Touffes gliales/astrocytaires		Fibres denses au profil étoilé dans les segments proximaux des prolongements astrocytaires	+	-	+
	Plaques gliales/astrocytaires		Lésions punctiformes formant des grappes au sein des segments distaux des prolongements astrocytaires	+	-	+
	Astrocytes épineux		marquage épineux principalement retrouvé dans la substance blanche et les couches subpial/subépendymal	+	-	+ / -
	Inclusions astrocytaires globulaires		marquage globulaire dans les prolongements astrocytaires	+	-	-
	bush-like astrocytes		marquage fin et granulaire dans les prolongements astrocytaires	+	-	-
	Astrocytes ramifiés		Cellules aux noyaux excentriques aux prolongements épais et ramifiés	-	+	-

**Figure 8 : Description et caractérisation immunohistochimique des lésions astrocytaires associées à l'accumulation de protéines tau pathologiques.** La caractérisation des lésions comprend une visualisation du profil d'immunoréactivité AT8, la composition en isoformes 3R/4R et la positivité au marquage Gallyas. Modifié de (Kovacs 2015)

Type cellulaire	Type de lésion	Immunoréactivité AT8	Description	4R	3R	Gallyas
<i>Oligodendrocytes</i>	Corps bobinés		Marquage en virgule ou spirale intracytoplasmique	+	-	+
	Inclusions oligodendrocytaires globulaires		Marquage globulaire et sphérique dense d'un diamètre jusqu'à 15 µm	+	+ / -	+

**Figure 9 : Description et caractérisation immunohistochimique des lésions oligodendrocytaires associées à l'accumulation de protéines tau pathologiques.** La caractérisation des lésions comprend une visualisation du profil d'immunoréactivité AT8, la composition en isoformes 3R/4R et la positivité au marquage Gallyas. Modifié de (Kovacs 2015)



**Figure 10 : Profils biochimiques des protéines tau pathologiques propres aux différentes tauopathies.** Le profil biochimique a été obtenu à l'aide d'un anticorps phospho-dépendant (AD2, pSer396/pSer404, (Buée-Scherrer et al. 1996)) et une représentation schématique de la composition en isoformes des différentes bandes a été systématiquement ajoutée. Dans les tauopathies impliquant à la fois des isoformes 3R et 4R, des immunoréactivités positives sont observées aux poids moléculaires de 55, 64, 69 et 74 kDa et sont respectivement associées aux isoformes 0N3R, 1N3R et 0N4R, 2N3R et 1N4R et enfin, 2N4R. Dans les tauopathies spécifiques de l'isoforme 4R, des bandes positives sont observées aux poids moléculaires de 64, 69 et 74 kDa et sont associées aux isoformes 0N4R, 1N4R, puis 2N4R. Enfin, les tauopathies spécifiques de la forme 3R sont associées à des bandes positives aux poids moléculaires de 55, 64 et 69 kDa qui révèlent la présence d'isoformes 0N3R, 1N3R, puis 2N3R. La bande de plus haut poids moléculaire associée à ces profils est systématiquement de très faible intensité et ne sera pas prise en compte pour définir les profils biochimiques propres aux différentes tauopathies. Modifié de (Buée et al. 2000).

Le tableau ci-dessous (Figure 11) reprend les mutations héréditaires et/ou facteurs de susceptibilité géniques, les isoformes et les types de lésions associés aux tauopathies les plus fréquentes.

Plus loin dans ce manuscrit, il sera montré que ces phénotypes lésionnels et biochimiques propres aux différentes tauopathies sont reproduits à l'identique, après injection chez des sujets sains (Clavaguera et al. 2013). Ces observations permettront d'associer les tauopathies à différents souches de protéines tau pathologiques.

	PiD	PSP	CBD	GGT	CTE	PART	AGD	AD	FTDP-17	
Mutations héréditaires Susceptibilité génique (haplotype)		haplotype H1/H1c	haplotype H1/H1c	haplotype H1/H1c, APOE e3		haplotype H1/H1c	haplotype H1/H1c, APOE e2	Mutations dans APP, PSEN 1 et 2 Haplotype APOE e4, BIN1, CLU, ABCA1, PICALM....	Mutations de tau (R406W, V337M, G272V, P301L...)	
3R / 4R / 3R-4R	3R	4R	4R	4R	3R / 4R	3R / 4R	4R	3R / 4R	3R, 4R, 3R / 4R	
<b>Lésions neuronales</b>										
Pré-dégénérescences neurofibrillaires		+	+ / -		+	+ / -	+	+	Selon le(s) isoforme(s) impliqué(s) similitudes avec les lésions AD, PSP, CDC ou PiD	
Dégénérescences neurofibrillaires		+	+ / -		+	+ / -		+		
Corps de Pick	+									
Inclusions cytoplasmiques sphériques			+	+						
Couronnes								+		
Fibres tortueuses		+	+	+ / -	+ / -	+ / -		+		
Grains argyrophiles							+			
<b>Lésions astrocytaires</b>										
Touffes gliales/astrocytaires		+		+ / -	+ / -					
Plaques gliales/astrocytaires			+							
Astrocytes épineux		sujets âgés	sujets âgés		+ / -	sujets âgés	sujets âgés	sujets âgés		
Inclusions astrocytaires globulaires				+						
Bush-like astrocytes		+ / -		+ / -			+			
Astrocytes ramifiés	+									
<b>Lésions oligodendrocytaires</b>										
Corps bobinés		+	+	+ / -		+	+			
Inclusions oligodendrocytaires globulaires	+ / -			+						

**Figure 11 : Tauopathies** Caractérisation sur base des mutations héréditaires et/ou facteurs de susceptibilité géniques associés, composition en isoformes 3R et/ou 4R des lésions et profil lésionnel complet propre à chacune des tauopathies présentées. PiD (=maladie de Pick) ; PSP (=paralysie supranucléaire progressive) ; CBD (=dégénérescence cortico basale) ; GGT (=tauopathie gliale globulaire) ; CTE (=encéphalopathie traumatique chronique) ; PART (=tauopathie primaire liée à l'âge) ; AGD (=maladie à grains argyrophiles) ; AD (=maladie d'Alzheimer) et FTDP-17 (=démences fronto-temporales associées au parkinsonisme et liée au chromosome 17) Modifié de (Kovacs 2015)

## **II. Tauopathies à l'évolution spatio-temporelle prédictible**

Un des objectifs de ce travail de thèse étant de prévenir *in vivo* l'évolution intracérébrale des tauopathies, il est intéressant de noter que plusieurs de ces pathologies semblent suivre une progression spatiotemporelle hiérarchique et systématique au sein du cerveau. Les schémas d'évolution cérébrale des lésions de tau, les plus documentés à ce jour, concernent la maladie à grains argyrophiles (AGD) et la maladie d'Alzheimer (AD) qui sont décrites dans ce chapitre.

Dernièrement, une propagation systématique et prévisible des lésions, a également été mise en évidence dans la paralysie supranucléaire progressive (PSP) (Pandya, Mezas, and Raj 2017) et la maladie de Pick (PiD) (Irwin et al. 2016).

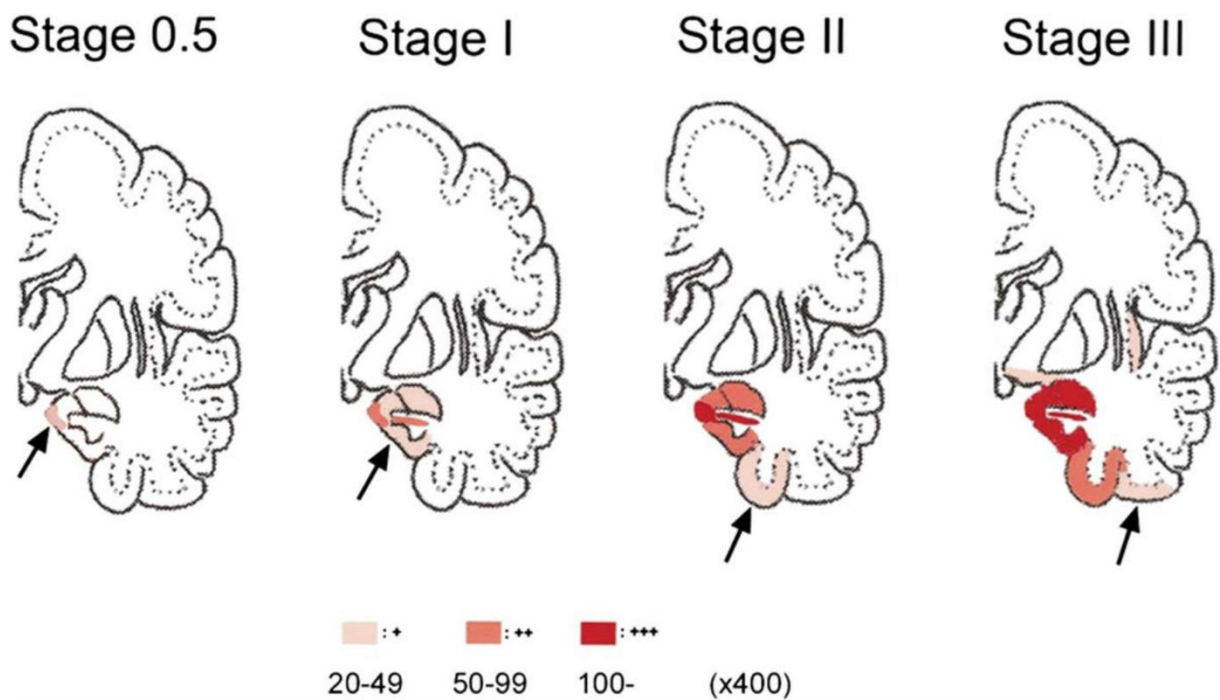
### ***II.1 Maladie à grains argyrophiles (AGD)***

Les aspects cliniques de la maladie à grains argyrophiles rapportent un déclin cognitif progressif, une incontinence urinaire, des troubles de la mémoire et des changements de personnalités impliquant souvent un excès d'agressivité et de mauvaise humeur (Tolnay and Braak 2011).

Les caractéristiques neuropathologiques de l'AGD comprennent l'atrophie du gyrus ambiant et la présence, dans les lobes temporaux médians, de grains argyrophiles constitués de protéines tau 4R. Ces grains argyrophiles typiques, à l'origine de la terminologie de cette pathologie, sont associés à des pré-dégénérescences neurofibrillaires et des dépôts oligodendrocytaires bobinés au niveau de la substance blanche hippocampique et péri-amygdaloïde. Des astrocytes 'bush-like' peuvent également être observés au sein de l'amygdale.

L'évolution spatiotemporelle de la maladie à grains argyrophiles progresse systématiquement et chronologiquement dans des régions spécifiques du cerveau. En conséquence, des stades de Braak, allant de I à IV, ont été définis pour décrire et évaluer l'ampleur de la pathologie, concomitante à la progression des lésions au sein des régions cérébrales cibles. (Figure 12) Au stade 0.5, le gyrus ambiant et la partie antérieure de la CA1 sont principalement affectés; l'amygdale et les noyaux hypothalamiques latéraux sont également légèrement touchés. Au stade I, les grains argyrophiles s'étendent à l'ensemble de la CA1 et apparaissent au sein du gyrus denté et du pré-subiculum. Au stade II, les lésions se propagent aux régions CA2 et CA3, à l'ensemble des noyaux hypothalamiques, dans les cortex temporaux antérieurs, cingulaires, insulaires et orbitofrontaux, ainsi que dans les noyaux accumbens et le septum. Une ballonnisation des neurones au sein de l'amygdale et une spongiose superficielle dans le gyrus ambiant sont également notées. Dans le dernier stade (III) la

tauopathie atteint le gyrus temporal inférieur, le néocortex et le tronc cérébral (Isidro Ferrer, Santpere, and Van Leeuwen 2008; Saito et al. 2004).



**Figure 12 : Stades de Braak décrivant l'évolution spatiotemporelle des lésions dans la maladie à grains argyrophiles.** Illustration de la propagation des lésions dans le plan coronal. Au stade 0.5, les grains se localisent au sein du gyrus ambiant et la région CA1 de l'hippocampe. Au stade I, les grains argyrophiles sont abondamment ( $\geq 20$  grains par  $400 \times$  champ de vision) présents sur l'ensemble de la CA1, au sein du gyrus denté et du pré-subiculum. Au stade II, les lésions s'étendent à l'ensemble de l'hippocampe et aux noyaux hypothalamiques, aux cortex temporaux antérieurs, cingulaires, insulaires et orbito-frontaux, mais également aux noyaux accumbens et au septum. Enfin, au stade III, les grains argyrophiles atteignent la face inférieure du gyrus temporal, le néocortex puis le tronc cérébral Modifié de (Saito et al. 2004) et reproduite avec l'autorisation du Journal of Neuropathology and Experimental Neurology. (Heiko Braak and Braak 1987)

Des grains argyrophiles peuvent également être observés chez des individus vieillissants non atteints de démence (Josephs et al. 2008).

De manière similaire à la PSP, CBD, PART et GGT, le génotype MAPT H1/H1 semble plus fréquent chez les patients souffrant de la maladie à grains argyrophiles ce qui indique un risque plus élevé de développer la pathologie lors de la possession de ces haplotypes (Togo et al. 2002). En ce qui concerne les haplotypes du gène de l'apolipoprotéine E (APOE), dans la tauopathie à grains argyrophiles, l'incidence de l'allèle  $\epsilon 2$  semble plus élevée que celle de l'allèle  $\epsilon 4$  (Tolnay and Braak 2011).

## *II.2 Maladie d'Alzheimer (AD)*

Selon l'Alzheimer's Association, la maladie d'Alzheimer représente entre 60% et 80% de l'ensemble des démences. Au-delà de 65 ans, le risque de développer cette maladie neurodégénérative double tous les 5 ans. Cette démence, très fréquente au sein de nos populations vieillissantes, se caractérise principalement par l'acquisition progressive de déficits cognitifs. Les critères diagnostiques exigent qu'au moins deux domaines de cognition soient affectés, chez les patients incluant des défauts de mémorisation, problèmes de langage ou encore, un déclin des fonctions visuo-spatiales, exécutives (capacité d'adaptation, de raisonnement et de concentration) ou motrices (capacité à exécuter des activités motrices habiles).

La maladie d'Alzheimer est une tauopathie relativement complexe. En effet, elle est caractérisée par l'apparition concomitante de plaques séniles composées de dépôts extracellulaires de peptides amyloïdes- $\beta$  en parallèle des dégénérescences neurofibrillaires, composées de dépôts intra-neuronaux de protéines tau agrégées (Fig. 2). Dans une certaine mesure, les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires peuvent survenir de manière spontanée au cours du vieillissement. De ce fait, la pose du diagnostic de la maladie d'Alzheimer est complexe et nécessite une corrélation entre l'abondance et la progression de ces lésions et l'évolution des symptômes cliniques.

Très vite, les chercheurs ont essayé de comprendre le lien unissant ces 2 pathologies concomitantes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Šimić et al. 2016).

Dans un premier temps, la mutation non-sens V717I «London», dans le gène du précurseur amyloïde (APP), a été identifiée comme responsable de l'apparition de formes héréditaires précoces, à transmission autosomique dominante, de la maladie d'Alzheimer (Goate et al. 1991).

Hardy et ses collègues (Hardy and Allsop 1991; Hardy 2006) ont alors proposé l'hypothèse de la «cascade amyloïde » pour expliquer le développement de la maladie d'Alzheimer, ce qui a énormément influencé la recherche au cours de ces 30 dernières années. Selon celle-ci, l'accumulation de protéines tau pathologiques dans la maladie d'Alzheimer ne serait pas un événement initiateur mais une conséquence directe de la pathologie amyloïde. Dans les cas familiaux ou sporadiques de démence de type Alzheimer, la production excessive de peptide amyloïde  $\beta$ , suite à un clivage de l'APP par l'enzyme  $\beta$ -sécrétase (BACE) et le complexe enzymatique  $\gamma$ -sécrétase (préséniline, nicastrine, APH-1 (anterior pharynx defective 1) et PEN-2 (presenilin enhancer 2) (Blanquet et al. 1987; Robakis et al. 1987; P. H. St. George-Hyslop et al. 1987), serait l'événement pathologique déclencheur, responsable des autres phénotypes pathologiques : dégénérescences neurofibrillaires, astrocytose, activation microgliale... Par la suite d'autres mutations provoquant l'apparition précoce de la démence de type

Alzheimer ont été mises en évidence sur le précurseur amyloïde, E693G « Arctic » et E693D « Osaka » (Lowenberg and Waggoner 1934) mais également sur le gène de la préséniline 1 (PSEN1) (P. S. George-Hyslop et al. 1992; Sherrington et al. 1995) et son homologue, la préséniline 2 (PSEN2) (Levy-Lahad et al. 1995). Les présénilines faisant partie du complexe  $\gamma$ -sécrétase, responsable du clivage du précurseur amyloïde et de la libération de peptides amyloïdes  $\beta$ , ces mutations vont également dans le sens d'une potentielle cascade amyloïde dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer.

La  $\gamma$ -sécrétase est en mesure de cliver l'APP en 2 sites, libérant ainsi un peptide A $\beta$  de 40 ou 42 acides aminés. L'A $\beta$ 42 est plus susceptible de s'agréger pour former des plaques séniles que son homologue de 40 acides aminés. Toutes les mutations PSEN associées au développement précoce de la maladie d'Alzheimer induisent une augmentation du ratio A $\beta$ 42 / A $\beta$ 40 sans pour autant augmenter la quantité totale de peptides amyloïdes (Czech, Tremp, and Pradier 2000; Citron et al. 1997).

La survenue précoce de la maladie d'Alzheimer, avant l'âge de 60 ans est le plus souvent d'origine génétique et dépend d'une transmission autosomique dominante 100% pénétrante. Bien que ces formes héréditaires représentent moins de 5% des cas, elles peuvent être causées par plus de 200 mutations pathogènes retrouvées dans l'APP (33 mutations, duplications), PSEN1 (185 mutations) et PSEN2 (13 mutations).

La plupart du temps (>95%), le développement de la maladie d'Alzheimer est plus tardif (>65ans) et de nature sporadique. Dans ce cas de figure, bien qu'on ne soit plus face à une transmission héréditaire dominante, la possession de facteurs de susceptibilité génétiques peut augmenter le risque de développer la démence.

Grâce au théorème de Bayes, il est possible d'étudier l'effet de la possession de certains allèles haplotypes sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Si le facteur de Bayes (BF) est de 1, la présence de l'allèle n'influence pas le risque de développer la démence. Au contraire, si le facteur est entre 3-10, 10-30 ou 30-100, on peut affirmer que la présence de l'allèle augmente probablement, certainement ou très certainement, le risque de démence.

A l'heure actuelle, avec un facteur de Bayes supérieur à 50, l'allèle  $\epsilon$ 4 de l'apolipoprotéine E (APOE) est le facteur de susceptibilité génétique associé à la plus haute augmentation du risque de développer la forme tardive de la maladie d'Alzheimer (W. J. Strittmatter et al. 1993; Corder et al. 1993). En comparaison aux individus présentant 2 allèles  $\epsilon$ 3 pour le gène APOE ( $\epsilon$ 3/ $\epsilon$ 3), les individus avec un exemplaire de  $\epsilon$ 4 ( $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 3) présente un risque 5 fois plus élevé de développer la forme tardive de la maladie d'Alzheimer, tandis que les personnes ayant deux copies de l'allèle  $\epsilon$ 4 ( $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4) sont 20 fois plus à risque (Warren J. Strittmatter 2012). Il semblerait que l'allèle  $\epsilon$ 4 ne soit pas associé à une augmentation de la production de peptides A $\beta$  42, mais à une diminution de la clairance des peptides



amyloïdes au sein du cerveau (Mawuenyega et al. 2010; Castellano et al. 2011), potentiellement expliquée par une diminution de la production des auto-anticorps anti- A $\beta$  chez les porteurs de l'allèle (Qu et al. 2014).

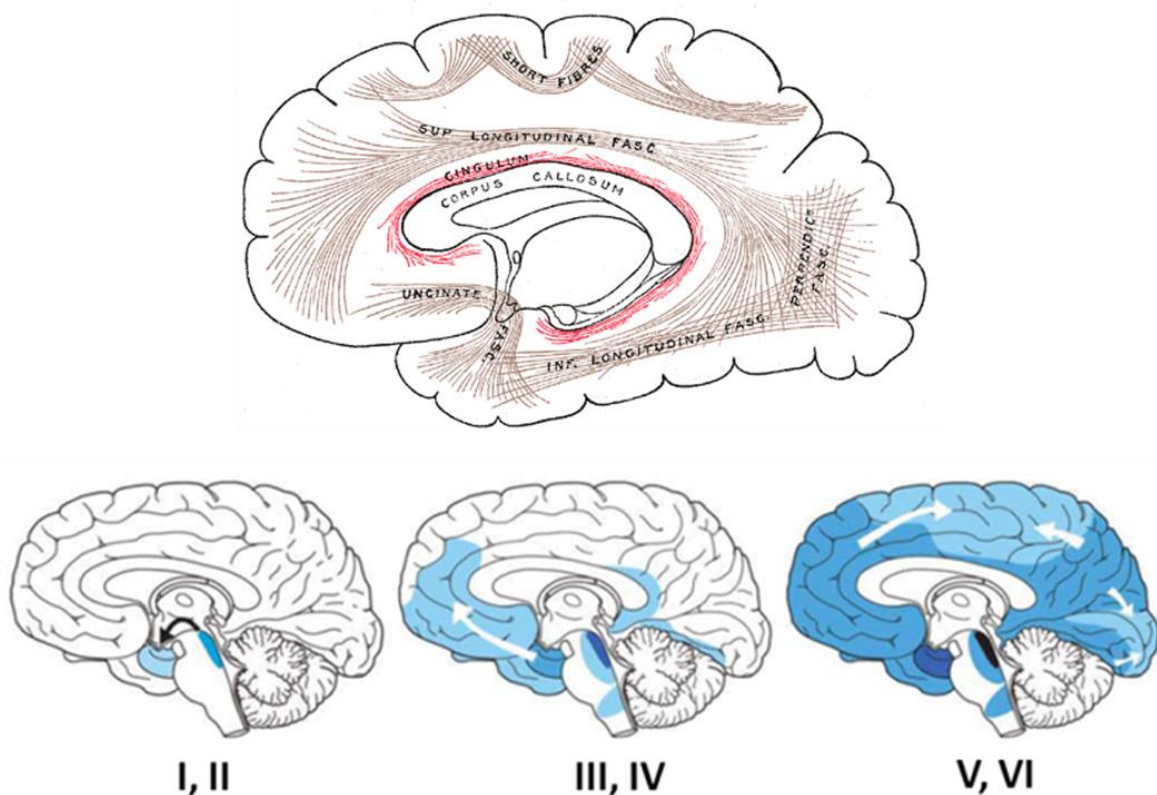
Sur 695 gènes et leurs 2973 polymorphismes, plus de 30 gènes se sont vus associés à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer (BIN1 (BF = 23,4), CLU (BF = 20,1), ABCA7 (BF = 18,8), CR1 (BF = 18,1), PICALM (BF = 17,3), MS4A6A (BF = 8,7), CD33 (BF = 7,7), MS4A4E (BF = 6,9), CD2AP (BF = 6,6), TREM2 (rs75932628) (Jonsson et al. 2013; Guerreiro et al. 2013) et PLD3 (phospholipase D3; Val232Met) (Cruchaga et al. 2014)) (www.alzgene.org consulté le 11 février 2015). La possession de ces allèles facteurs de susceptibilité génétique ne semble pas avoir une influence majeure sur la vitesse de progression de la maladie d'Alzheimer mais il est vrai qu'à ce jour, l'effet sur le développement et l'évolution des symptômes reste peu étudié (Hollingworth et al. 2011; Lardenoije et al. 2015).

Dans la maladie d'Alzheimer, les lésions de tau sont composées d'isoformes 3R et 4R. En plus des dégénérescences et pré-dégénérescences neurofibrillaires, les lésions de tau se présentent sous forme de fibres tortueuses et de neurites dystrophiques formant la couronne encerclant les plaques séniles.

Une particularité de la maladie d'Alzheimer est la présence de protéines tau tronquées pro-agrégantes au sein des dégénérescences neurofibrillaires dont l'apparition est en corrélation avec l'évolution de la démence (Basurto-Islas et al. 2008). En effet, la troncation de la protéine tau au niveau du résidu Glu391 semble suffisante pour induire une hyperphosphorylation en certains sites pathologiques spécifiques à la démence (McMillan et al. 2011). En comparaison à la protéine tau sauvage, la forme tronquée par la caspase 3 au niveau du résidu Asp421 semble former plus aisément des structures fibrillaires hyperphosphorylées (J.-H. Cho and Johnson 2004). Enfin, la troncation de la protéine tau au niveau des résidus 243-441 (Tau-CTF24) augmente ses propriétés agrégatives, sa ainsi que sa vitesse de propagation (Matsumoto et al. 2015). Des études ont montré que la troncation au niveau C-terminal de la protéine tau serait associée à une augmentation des propriétés agrégatives, contrairement à la troncation de l'extrémité N-terminale (délétion des résidus 2-18) qui aurait l'effet inverse (T. Chris Gamblin, Robert W. Berry, and Binder\* 2003).

Enfin, de manière similaire à la maladie à grains argyrophiles ; la progression spatiotemporelle des dégénérescences neurofibrillaires et des fibres tortueuses au sein de la maladie d'Alzheimer suit un schéma systématique entre des régions neuro-connectées (Figure 13), qui corrèle étroitement avec l'évolution clinique des symptômes. La découverte de cette progression systématique et de ce fait, prévisible des neurodégénérescences, a permis de définir six stades dans la maladie d'Alzheimer, basés sur l'état d'avancement de la tauopathie. Dans le cas de la tauopathie relative à la maladie d'Alzheimer, les premières lésions surviennent dans le lobe temporal médian au niveau du locus coeruleus, des

régions trans-enthorinale et enthorinale (stades I-II) puis dans l'allocortex limbique et le néocortex adjacent (stades III-IV) et enfin, dans les champs primaire et secondaire du néocortex (stades V-VI). (Braak and Braak, 1991; Delacourte et al., 1999; Duyckaerts et al., 1997). Les lésions évoluant le long des fibres d'association cérébrales, ceci suggère une progression trans-synaptique des tauopathies. Les premiers signes de déclin cognitifs, traduits par des changements de personnalité et l'apparition de pertes mnésiques, ne surviennent qu'à partir d'un stade de Braak de niveau IV. La pose du diagnostic de la maladie d'Alzheimer sera encore un peu plus tardive, à des stades où la mort neuronale, causée par les lésions pathologiques de protéines tau, est très importante. Cette pose très tardive du diagnostic clinique de la démence explique les difficultés rencontrées lors des essais thérapeutiques.



**Figure 13 : Stades de Braak décrivant l'évolution spatiotemporelle au sein de régions neuroconnectées de la pathologie tau dans la maladie d'Alzheimer.** Illustration de la propagation des dégénérescences neurofibrillaires et fibres tortueuses dans le plan sagittal. Dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer (stades I-II), les lésions de tau surviennent dans le lobe temporal médian au niveau du locus coeruleus, des régions trans-enthorinale et enthorinale. Dans les stades III-IV les lésions se propagent dans l'allo-cortex limbique et le néocortex adjacent et dans les derniers stades (V-VI) les dégénérescences atteignent les champs primaire et secondaire du néocortex, s'étendant ainsi sur presque l'entièreté du système nerveux central. Le schéma supérieur, reprenant les principales fibres d'association cérébrales, confirme une propagation spatiotemporelle entre des régions neuroconnectées. Modifié de (Jouanne, Rault, and Voisin-Chiret 2017) et schéma des fibres d'association : modifié par Henry Gray sur base de « Anatomy of the Human Body, 1918 ».

### *II.3 Progression et propagation des tauopathies*

En 1978, De Boni et Crapper ont montré que le traitement de cultures primaires fœtales de neurones corticaux humains avec un extrait de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer induisait, dès 14 jours d'incubation, l'apparition progressive de structures fibrillaires hyperphosphorylées morphologiquement comparables à celles observées chez le patient. Les neurones en culture présentant ces fibres de tau abordaient une membrane plasmique intacte, un cytoplasme gonflé contenant un nombre réduit d'organites, des mitochondries d'apparence plus dense que d'ordinaire et des microtubules à l'allure fragmentée. À cette époque, les chercheurs considéraient ces fibres comme le résultat d'un possible assemblage en hélices de neurofilaments et expliquaient leur apparition en culture par la présence de produits métaboliques ou viraux dans l'extrait de cerveau. Ils envisageaient également, au niveau des cellules en culture, un transfert d'agents infectieux de type viral dont la réplication serait responsable de l'apparition des structures fibrillaires (De Boni and Crapper 1978).

Ce n'est qu'en 1985, grâce au professeur Jean-Pierre Brion que l'on identifia la protéine tau comme composant majeur des paires de filaments hélicoïdaux (Brion et al., 1985). Un an plus tard, Khalid Iqbal mit en évidence l'état anormalement hyperphosphorylé de cette protéine tau chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Il posa également l'hypothèse que cette altération des modifications post-traductionnelles de la protéine explique la défaillance de l'assemblage des microtubules, ainsi que l'apparition des filaments hélicoïdaux chez les patients (Khalid Iqbal et al. 1986). Enfin, c'est en 1991 que Braak et Braak ont constaté et décrit l'évolution spatiotemporelle systématique et prévisible de la tauopathie propre à la maladie d'Alzheimer, au sein de régions neuro-connectées du cerveau. (Braak and Braak, 1991; Delacourte et al., 1999; Duyckaerts et al., 1997).

Sur base de ces informations, la communauté scientifique commença à considérer les tauopathies comme des maladies de type prion (Frost, Jacks, and Diamond 2009). Selon cette hypothèse, une fois formés; les agrégats hyperphosphorylés de protéines tau présentent une conformation pathologique (« les seeds ») et se comportent comme des amorces capables de recruter et de modifier la conformation de la protéine tau physiologique, ce qui aboutit progressivement à l'apparition et accumulation de filaments insolubles et hyperphosphorylés de tau (PHFs ; 'paired helical filaments'). La transmission intercellulaire des amorces expliquerait la progression spatiotemporelle hiérarchique des tauopathies au sein du cerveau.

### III. Les tauopathies : des prion-like disease ?

#### III.1 Les maladies à prion

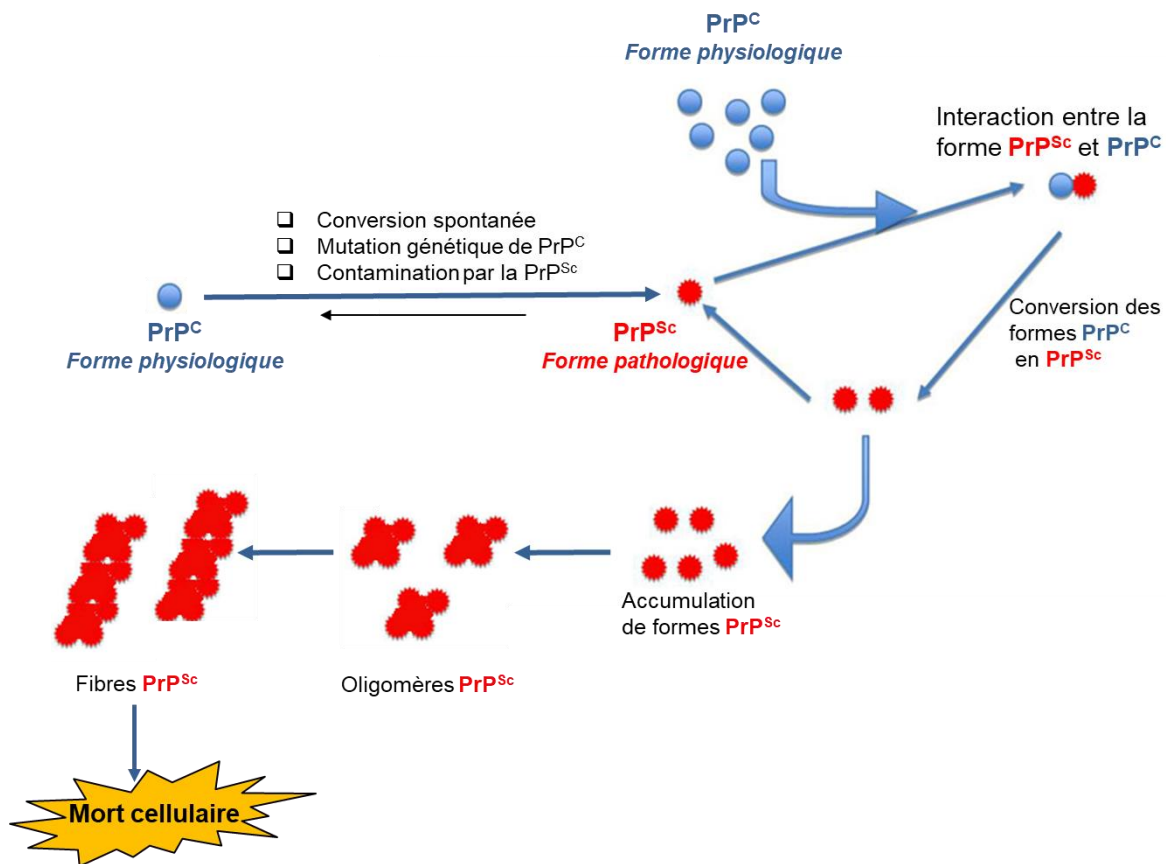
Les maladies à prion ou encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) sont des maladies neurodégénératives rares caractérisées par l'accumulation d'agrégats de la protéine prion intracellulaire repliée sous une conformation pathologique. Chez l'homme, on distingue trois maladies à prions : la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), l'insomnie fatale familiale (IFF) et le syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS). Ces maladies sont caractérisées par une évolution rapide et fatale et aucun traitement n'est actuellement disponible.

La cause de ces maladies peut-être **génétique** (en réponse à une mutation dans le gène codant pour la protéine prion), **infectieuse** (secondaire à une contamination) ou **sporadique** (survenant de façon aléatoire). L'IFF et le GSS sont exclusivement associés à des mutations génétiques tandis que la MCJ se développe le plus souvent de manière sporadique (85%) (Prusiner 1998). Dans la forme sporadique, la MCJ évolue généralement sur une durée de 6 mois et atteint des patients de plus de 60 ans. Lors d'une origine génétique ou dans certains cas infectieux, l'initiation de la pathologie est plus précoce et son évolution plus lente. Il a été montré, que dans le cas de contaminations infectieuses, la période d'incubation pouvait dépasser 50 ans. (<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/maladies-prions-maladie-creutzfeldt-jakob>). Dans le cas de l'IFF et du GSS, la durée de l'évolution de la pathologie va de 6 mois à quelques années.

L'ensemble de ces maladies, communément appelées prionopathies présente plusieurs caractéristiques qui leur sont propres.

**Le vecteur de progression de ces pathologies est la protéine prion adoptant une conformation pathologique qui lui confère des propriétés d'agent de nucléation.** (Figure 14)

Dans les maladies à prion, la protéine physiologique PrP<sup>C</sup>, exprimée dans le système nerveux, adopte une conformation pathologique dite "scrapie" (PrP<sup>Sc</sup>) ; très serrée, hydrophobe et qui ne peut être dégradée. Les formes PrP<sup>Sc</sup>, possédant des propriétés d'agent de nucléation, vont, par contact, provoquer le mauvais repliement des protéines physiologiques PrP<sup>C</sup>. L'accumulation des formes PrP<sup>Sc</sup> nouvellement formées va induire leur oligomérisation puis l'agrégation sous forme d'agrégats fibrillaires toxiques de type amyloïdes qui induiront la mort cellulaire (Prusiner 1982; Fraser 2014).



**Figure 14 : Progression des prionopathies.** Le modèle de progression des maladies à prion repose sur une nucléation suite à l'apparition d'une forme pathologique PrP<sup>Sc</sup>. Cette forme PrP<sup>Sc</sup> est en mesure d'interagir avec les protéines PrP<sup>C</sup> physiologiques et de les stabiliser afin qu'elles adoptent une conformation pathologique similaire. L'accumulation intracellulaire des formes PrP<sup>Sc</sup> aboutit à la formation d'oligomères puis de fibres amyloïdes toxiques responsables de la mort cellulaire.

**L'évolution spatiotemporelle des prionopathies résulte d'une progression intercellulaire de la pathologie.**

La progression et la propagation au sein du cerveau des prionopathies, sont dues à la transmission intercellulaire de la protéine prion sous sa forme scrapie pathologique (PrP<sup>Sc</sup>).

**Les prionopathies se divisent en différentes souches caractérisées par des profils lésionnels et évolutifs distincts, reproductibles sur plusieurs générations.**

Les trois prionopathies humaines sont associées à trois souches scrapies distinctes de la protéine prion. L'injection respective de ces formes scrapies (la MCJ, l'IFF et le GSS) est en mesure de transmettre fidèlement à des primates, et de manière reproductible, les caractéristiques phénotypiques propres à ces prionopathies. Les formes scrapies des différentes maladies à prion sont, de ce fait, considérées comme des souches indépendantes capables d'induire des neurodégénérescences aux phénotypes distincts et aux profils et vitesses de propagations qui leurs sont propres (Brown et al. 1994; Gibbs et al. 1980; Comoy et al. 2015).

**Enfin, ces pathologies peuvent être transmises d'un individu à l'autre ce qui confère aux prionopathies, un caractère de type infectieux.**

Le caractère infectieux des maladies à prions a été mis en évidence chez l'homme suite à l'apparition d'encéphalopathies spongiformes (Kuru) au sein de tribus pratiquant des rites funéraires cannibales Anton Gajdusek. Il a été montré que la consommation du cerveau des défunts malades suffisait à transmettre la maladie à prion aux cannibales. Cette transmissibilité des maladies à prion fut également observée après administration, à de jeunes enfants, d'hormones de croissance extraites de l'hypophyse de personnes décédées et contaminées par le prion, mais également après greffe de cornée ou dure-mère issues de donneurs atteints. Depuis, l'hormone de croissance n'est plus d'origine humaine, mais produite par génie génétique et les greffes de dure-mère ont été interdites. Une transmission infectieuse iatrogène fut également mise en évidence suite à l'utilisation d'électrodes intracérébrales ou d'instruments neurochirurgicaux au temps où les méthodes conventionnelles de stérilisation n'étaient pas en mesure d'éliminer le risque prion. Enfin, la forme prion bovine s'est révélée en mesure de contaminer spontanément d'autres espèces (homme, félin, chèvre) par le biais de consommation de produits dérivés de bovins malades. En effet, en pleine crise de la vache folle, des cas d'encéphalopathies spongiformes sont survenus chez l'homme après consommation de viandes contaminées par le prion. Depuis, des mesures de prévention ont été mises en place pour limiter au maximum ce risque de contamination inter-espèces. En résumé, la transmission « infectieuse » des prionopathies peut être due à une contamination iatrogène ou au cannibalisme inter-individus, à la consommation de produits dérivés d'espèces atteintes, ou encore à une transmission horizontale mère-fœtus dans le cas spécifique de la tremblante du mouton (Ironsides, Ritchie, and Head 2005; Wadsworth and Collinge 2007; Telling et al. 1996; Safar et al. 1998; Legname et al. 2006).

A l'heure actuelle, aucune transmission inter-individus de type infectieuse n'a été mise en évidence au sein des tauopathies. Bien qu'aucun chapitre ne sera dédié à la comparaison des tauopathies et des prionopathies sur ce sujet, je tenais tout de même à relever quelques points importants.

Jusqu'il y a peu, la maladie d'Alzheimer était considérée comme une maladie exclusivement humaine, n'affectant aucune autre espèce. Récemment, il a été montré que les dauphins et les chats domestiques stérilisés pouvaient également développer une maladie de vieillesse s'apparentant à la maladie d'Alzheimer en présentant simultanément une pathologie amyloïde et une tauopathie. Ces découvertes étant récentes, et l'homme ne consommant ni viande, ni produit dérivé des dauphins ou des chats domestiques dans son alimentation générale, il est impossible de savoir si, la maladie d'Alzheimer pourrait être transmise telle la forme prion bovine.

Les seules recherches pertinentes disponibles, en vue d'étudier le risque potentiellement infectieux des tauopathies, sont les travaux visant à déterminer si les patients ayant reçu des injections d'hormones de croissance dérivées de cadavres humains, en plus d'avoir été exposés au risque prion, ont également été plus à risque de développer la maladie d'Alzheimer. Selon Irwin et ses collaborateurs, le risque de développer la maladie d'Alzheimer chez ces patients est resté inchangé. Bien que des formes pathologiques de tau et des plaques amyloïdes ont été observées chez des patients ayant reçu les injections d'hormones, ces lésions ne furent pas directement associées au développement de démences. De plus, bien que la présence de protéines tau pathologiques et de peptide A $\beta$  ait été confirmée dans la fraction insoluble de certains échantillons d'hormones, l'administration de ces lots d'hormones n'est pas associée à une augmentation du risque de développer la maladie d'Alzheimer. Pourtant, sur 8 patients décédés de la MCJ suite à l'injection des hormones de croissance, John Collinge a montré que six patients présentaient une pathologie amyloïde. Ces patients, âgés entre 36 et 51 ans, étaient pourtant trop jeunes pour présenter une telle pathologie. Sur base de l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'absence de pathologie tau chez ces patients pourrait être expliquée par une phase trop précoce du développement. Le professeur Duyckaerts et ses collaborateurs ont récemment montré que sur 24 français décédés de la maladie de Creutzfeldt Jakob après exposition aux hormones de croissance, 1 patient présentait des dépôts amyloïdes et 3 patients des dépôts de protéines tau pathologiques (Duyckaerts et al. 2018). La période d'incubation du prion ayant été plus courte chez ces français que dans les études précédentes (18 ans versus 23 ans), l'incidence réduite de la pathologie amyloïde dans cet échantillon français pourrait relever d'une phase d'incubation très lente de la pathologie (>>18ans) et de ce fait ; pas encore suffisamment développée au moment du décès des 24 patients français. Pour rappel, la période d'incubation associée à certaines contaminations prion dépassent 50 ans, il est donc envisageable que les patients soient décédés avant la fin de la période d'incubation propre à la transmission des tauopathies et de la pathologie amyloïde.

Expérimentalement, Il fut montré que les prionopathies étaient transmissibles par injection intracérébrale ou intrapéritonéale, voie orale, transfusion sanguine ou encore aérosol de la forme scrapie. Tout comme les prionopathies, l'injection intracérébrale (Clavaguera et al. 2009, 2013) ou intrapéritonéale (Clavaguera et al. 2014) d'extraits des différentes souches de tauopathies induit le développement et la propagation de lésions *in vivo* (Stancu et al. 2015; Ahmed et al. 2014). Aucune information n'est ; à notre connaissance, disponible au sujet des transmissions par voie orale ou aérosol des tauopathies.

Le seul point pour lequel des résultats rassurants se sont vus observés, est l'étude des risques relatifs à la transfusion sanguine. En effet, à notre connaissance, les risques potentiels d'une transmission des

maladies à prions via des transfusions sanguines, sont uniquement basés sur des modèles expérimentaux impliquant des transfusions sanguines complètes. Les quantités de protéines à prion pathologiques potentiellement transférées lors de transfusions sanguines chez l'Homme étant inconditionnellement plus faibles et de ce fait, beaucoup moins à risque, rien ne nous indique qu'un tel risque de transmission puisse être observé. Concernant le risque expérimental de transmission des tauopathies via la transfusion sanguine, des résultats préliminaires d'un laboratoire canadien semblent montrer que le partage d'une même circulation sanguine via un rattachement chirurgical entre une souris transgénique surexprimant le peptide amyloïde et une souris sauvage suffit à induire l'apparition de plaques amyloïdes dans le cerveau de l'individu sauvage (*Blood-derived amyloid-β protein induces Alzheimer's disease pathologies*). Cela n'a, à notre connaissance, pas été réalisé au départ de souris transgénique pour la protéine tau. Par ailleurs, les études d'Edgren ont montré que sur 2.1 millions de transfusions sanguines réalisées en Suisse et au Danemark, les personnes ayant reçu des transfusions provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ne sont pas plus à risque de développer cette démence durant les 25 années suivant la transfusion. Bien que ces résultats se voient rassurants, comme suggéré ci-dessus, il est important de garder à l'esprit que le développement de la démence pourrait demander un temps d'incubation supérieur à 25 ans. Les transfusions sanguines provenant de patients prédisposés à développer la maladie d'Alzheimer de par leurs allèles APOE-ε4, ne semble pas non plus associées à une augmentation du risque de développer la pathologie chez les personnes transfusées (O'Meara et al. 1997)

En résumé, sur base de ces informations, bien qu'aucune transmission à caractère infectieux similaire aux maladies à prion n'a, à ce jour, été mise en évidence pour la maladie d'Alzheimer, nous ne sommes pas en mesure de rejeter avec certitude l'hypothèse du caractère infectieux des tauopathies. Il est donc vivement conseillé de faire preuve d'une grande prudence en laboratoire lors de la manipulation d'extraits de cerveaux contenant des formes pathologiques de tau.

En plus des tauopathies, d'autres maladies neurodégénératives semblent présenter une propagation intracérébrale similaire aux maladies à prion, suivant un schéma de progression bien établi et induisant progressivement le mauvais repliement puis l'agrégation fibrillaire d'une protéine physiologique (Frost and Diamond 2010). Ces autres maladies dites « de type prion » comprennent le peptide amyloïde-béta dans la maladie d'Alzheimer et l'alpha-synucléine dans la maladie de Parkinson.



### *III.2 La protéine tau pathologique : vecteur de progression des tauopathies et agent de nucléation*

*Afin de définir si la progression et la propagation des tauopathies s'apparentent à celle des prionopathies, il a été vérifié que la protéine tau pouvait être considérée comme le vecteur de progression de la pathologie, en étudiant ses propriétés potentielles d'amorces enclines à recruter et induire l'agrégation de la protéine tau physiologique pour former des fibres amyloïdes.*

#### III.2.1 La protéine tau pathologique : agent de nucléation en mesure de recruter la tau physiologique

C'est en 1996 qu'il a été montré pour la première fois que la protéine tau hyperphosphorylée, contenue dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, était en mesure de recruter et d'induire l'agrégation de la protéine tau soluble jusqu'à former des filaments (Del C. Alonso, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996). Les propriétés d'agent de nucléation de la protéine tau sous sa forme pathologique ont ensuite été confirmées par des études montrant que l'incubation en présence de petites quantités de fibrilles préformées de protéines tau (J. L. Guo and Lee 2011) ou de PHFs isolés au départ de cerveaux extraits de patients atteints de la maladie Alzheimer (Santa-Maria et al. 2012), permettait le recrutement de la protéine tau exprimée en culture pour former des inclusions filamenteuses s'apparentant aux dégénérescences neurofibrillaires. L'apparition intracellulaire de ces fibres de protéines tau s'accompagne d'une perte de stabilité des microtubules, expliquée par la séquestration de la protéine soluble au sein des agrégats (J. L. Guo and Lee 2011).

Les protéines tau extracellulaires de haut poids moléculaire, retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou dans des modèles transgéniques murins, sont internalisées en culture et également en mesure d'induire l'apparition d'agrégats intracellulaires (Takeda et al. 2016).

C'est en 2009 que Florence Clavaguera démontra pour la première fois les propriétés d'agent de nucléation de la protéine tau pathologique *in vivo*. En effet, son équipe a montré que l'injection intracérébrale d'extraits de cerveaux de souris transgéniques P301S chez des souris surexprimant une protéine tau sauvage (ALZ17), induisait l'apparition d'agrégats de tau ce qui traduit un recrutement intracellulaire et une agrégation de la protéine tau sauvage en présence de protéines tau pathologiques (Clavaguera et al. 2009). Trois ans plus tard, les travaux de Liu et de Calignon ont démontré qu'en plus de s'auto-agréger dans les cellules où elle est surexprimée, la protéine tauP301L

est en mesure de se propager dans des régions saines pour y induire l'agrégation de protéines tau murines endogènes. En effet, chez des souris transgéniques exprimant la protéine tau P301L au niveau du cortex entorhinal, des agrégats de protéines tau ainsi qu'une dégénérescence synaptique sont observés dans des régions cérébrales exprimant le transgène mais également dans des régions avoisinantes où le transgène n'est pas supposé être exprimé (De Calignon et al. 2012; L. Liu et al. 2012).

Il fut ensuite montré, dans des modèles transgéniques murins, que les fibres recombinantes (composées de protéine tau entière ou tronquée de part et d'autre des domaines de liaison aux microtubules) étaient également en mesure d'être internalisées, de recruter et de former des structures s'apparentant aux DNFs au contact des protéines tau mutées et pro-agrégantes exprimées dans les neurones des souris transgéniques (Iba et al. 2013; Peeraer et al. 2015).

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés à des études réalisées au départ de fibres recombinantes ou issues de cerveaux extraits de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Cependant, une partie de la communauté scientifique atteste que les formes fibrillaires de tau ne seraient pas les formes toxiques impliquées dans la progression de la pathologie. Selon eux, les réelles espèces à l'origine de la propagation seraient les oligomères de tau. Bien qu'à l'heure actuelle, la communauté scientifique n'est pas parvenue à se mettre d'accord concernant la nature des espèces toxiques propagatives, plusieurs études ont montré que les oligomères de tau présentaient également des propriétés d'agents de nucléation et étaient capables de recruter et d'induire l'agrégation de protéines tau sauvages ou mutées. En 2012, Lasagna Reeves et ses collaborateurs ont montré que l'injection intracérébrale d'oligomères de tau, purifiés au départ du cortex de cerveaux extraits de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, étaient responsables de l'apparition d'une conformation anormale de la protéine tau endogène murine (C. A. Lasagna-Reeves et al. 2012). Une autre étude a montré que l'injection intra-hippocampique dans des souris surexprimant la protéine tau humaine, d'oligomères cérébraux purifiés suite à une lésion traumatique chronique (TBI), induisait l'apparition de lésions et une accélération du développement des déficits cognitifs propres à ce modèle (Gerson et al. 2016).

### III.2.2 Implication de la phosphorylation dans la capacité de nucléation des protéines tau pathologiques

Très vite, il a été mis en évidence que les propriétés agrégatives de la protéine tau pathologique dépendent directement de son niveau de phosphorylation. En effet, après déphosphorylation par une alcaline phosphatase, les protéines tau issues de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ne semblent plus en mesure d'induire l'agrégation de la protéine tau soluble (Del C. Alonso, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996). Hu et ses collaborateurs ont confirmé l'implication de l'état anormalement phosphorylé des formes pathologiques de la protéine tau dans leur fonction d'agent de nucléation en mettant en évidence les répercussions d'une déphosphorylation sur la morphologie des lésions. L'injection d'une fraction enrichie en PHFs, déphosphorylés ou non par la phosphatase-2A, dans l'hippocampe de souris transgéniques, est associée à une perte de l'apparition étendue de dégénérescences neurofibrillaires au profit de l'apparition localisée de grains argyrophiles en présence du matériel fibrillaire déphosphorylés (Hu et al. 2016). Sur base de ces études, la phosphorylation semble impliquée et nécessaire pour la fonction d'agent de nucléation des protéines tau pathologiques

Néanmoins, il a été montré que l'ensemble des sites d'hyperphosphorylation typiques des formes pathologiques agrégées n'était pas forcément requis pour présenter des capacités agrégatives. En développant un système de mesure de l'agrégation par transfert d'énergie, la capacité de recrutement de la protéine tau surexprimée dans des souris P301S fut mise en évidence dès l'âge de 1,5 mois, soit environ un mois avant l'apparition des premiers signes de marquage histopathologique de la protéine tau (MC1 : conformation pathologique, AT8 et PG5 : acides aminés hyperphosphorylés et Thioflavin S : structures ordonnées en feuillets plissés  $\beta$ ) (Brandon B. Holmes and Diamond 2014) Quelques années plus tard, cette même équipe a montré, chez le patient Alzheimer, une activité de recrutement dans des régions cérébrales supposées être dépourvues de dépôts pathologiques. Une activité de nucléation a été également observée dans des fractions insolubles où la protéine tau n'était pas détectée (en ELISA) (Furman et al. 2017). Enfin, il fut montré que l'absence des épitopes phospho-dépendants caractéristiques des formes pathologiques de tau (AT8, AT100 et AT180), n'entachait en rien les fonctions d'agents de nucléation des protéines tau extracellulaires vésiculaires (Polanco et al. 2016).

En conséquence, il semblerait que seulement une partie des sites de phosphorylation soient requis pour que la protéine tau pathologique présente des propriétés agrégatives.

### III.2.3 Autres facteurs impliqués dans la capacité de nucléation des protéines tau pathologiques

En 2015, Falcon et ses collaborateurs ont montré que la délétion des motifs (275)VQIINK(280) et (306)VQIVYK(311) de la protéine tau P301S, abolit les propriétés d'amorces des fibres recombinantes, ce qui suggère l'implication de ces séquences dans le recrutement et/ou l'agrégation de la protéine tau physiologique (Falcon et al. 2015). Cette équipe a également rapporté l'implication de la structure tridimensionnelle, en démontrant que les fibres de protéines tau issues du cerveau de souris P301S présentent un pouvoir de recrutement/nucléation supérieur aux fibres recombinantes synthétiques (Falcon et al. 2015). Les fibres résultantes du recrutement de protéines tau recombinantes au départ de fibres isolées à partir de patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent une conformation distincte de celles produites au départ de fibres synthétiques, ce qui explique probablement les variations d'efficacité de nucléation observées entre les fibres endogènes et synthétiques (J. L. Guo et al. 2016). Les propriétés agrégatives limitées des fibres de protéines tau purement synthétiques ont été également mises en évidence *in vivo* où, contrairement aux fibres issues de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Audouard et al. 2016; J. L. Guo et al. 2016), elles ne sont pas en mesure d'induire l'apparition d'abondantes inclusions de tau dans le cerveau de souris non transgéniques exprimant uniquement la protéine tau murine endogène (J. L. Guo et al. 2016). Pour rappel, au départ de souris transgéniques exprimant une tau mutée pro-agrégante, l'injection de fibres synthétiques de tau s'était vue en mesure d'induire l'apparition d'inclusions pathologiques (Iba et al. 2013; Peeraer et al. 2015).

Enfin, il semblerait que le matériel humain présente des capacités agrégatives supérieures à celui issu de souris transgéniques. En effet, bien que les protéines tau de haut poids moléculaire retrouvées à la fois dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et des modèles transgéniques murins sont en mesure d'induire l'agrégation intracellulaire de tau, les protéines issues de LCR humain semblent associées à un plus haut potentiel de nucléation (Takeda et al. 2016).

### III.3 Transmission intercellulaire des tauopathies

Ensuite, il fut question de regarder si la transmission intercellulaire de ces formes pathologiques de tau aux fonctions d'agent de nucléation, étaient à l'origine de la propagation des tauopathies et responsables de l'évolution hiérarchique des lésions de tau au sein de régions neuroconnectées (Saper, Wainer, and German 1987; Arnold et al. 1991; Heiko Braak and Braak 1995)

En 2014, au sein de notre équipe, un transfert inter-neuronal de la protéine tau sous sa forme sauvage a été mis en évidence dans un système de chambres microfluidiques. Ce modèle comprend deux compartiments cellulairesensemencés avec des neurones issus de cultures primaires neuroconnectées par un réseau unidirectionnel d'axones passant au travers de micro-canaux. 48h après infection du premier compartiment avec un vecteur lentiviral codant pour la protéine tau sauvage (hTau1N4R-V5), une immunoréactivité V5 est observée dans le compartiment infecté, dans les axones présents au sein des micro-canaux et, de manière plus intéressante, dans les corps cellulaires des neurones du compartiment secondaire, ce qui traduit un transfert inter-neuronal des protéines tau sauvages (Dujardin, Lécolle, et al. 2014).

L'équipe a également développé un modèle *in vivo* de propagation de la protéine tau sauvage basé sur l'injection intracérébrale de vecteurs lentiviraux dans le cerveau de rat (Caillierez et al. 2013; Dujardin, Lécolle, et al. 2014). La protéine tau humaine exprimée grâce aux vecteurs est transférée au travers des axones des neurones de l'hippocampe ventral pour ensuite être internalisée par des neurones secondaires connectés dans des zones distantes du cerveau, ce qui confirme *in vivo*, le transfert inter-neuronal de protéines tau sauvages (Dujardin et al., 2014).

*Qu'en est-il du transfert inter-neuronal de la protéine tau sous une forme pathologique ou agrégée ?*

*In vitro*, il a été montré que, contrairement aux monomères, les agrégats extracellulaires de protéine tau étaient internalisés et induisaient la fibrillation de protéines tau intracellulaires. En co-culture, les agrégats intracellulaires nouvellement formés sont ensuite sécrétés puis internalisés par des cellules naïves où ils initient l'agrégation de la protéine tau endogène (Frost, Jacks, and Diamond 2009; Kfoury et al. 2012; Wu et al. 2016). Ce transfert intercellulaire directement médié par le milieu extracellulaire peut être amplifié et reproduit au travers de plusieurs générations de cellules.

Plusieurs études *in vivo* suggèrent également une **transmission intercellulaire** des formes pathologiques de tau. C'est le cas des travaux de Clavaguera montrant que l'injection intracérébrale d'extraits de cerveaux de souris P301L dans des souris surexprimant une protéine tau sauvage, induit l'apparition d'agrégats de tau au site d'injection et leur propagation dans des régions cérébrales avoisinantes (Clavaguera et al. 2009). D'autres groupes démontrent la capacité des formes pathologiques de tau à se propager dans des régions neuro-connectées pour y induire l'agrégation de protéines tau endogènes. Ceci suggère l'existence d'une **transmission inter-neuronale** des tauopathies. En effet, chez des souris transgéniques exprimant la protéine tau P301L au niveau du cortex enthorinal, des agrégats de tau ainsi qu'une dégénérescence synaptique sont observés où le transgène est exprimé mais également dans des régions cérébrales avoisinantes et potentiellement neuro-connectées où le transgène est présumé absent (hippocampe, gyrus denté, cortex cingulaire) (De Calignon et al. 2012; L. Liu et al. 2012). Quelques années plus tard, Yetman met en garde concernant l'utilisation et l'interprétation des données obtenues au départ de ces modèles d'expression restreinte au cortex enthorinal. En effet, bien que l'expression majoritaire du transgène se situe dans la région attendue, une expression non négligeable de ce dernier semble également détectée dans d'autres régions corticales. Il faut donc être prudent quant aux conclusions des études utilisant ces modèles (Yetman et al. 2016). L'implication de la transmission inter-neuronale dans la propagation des tauopathies fut confirmée par de nombreuses études. Notamment celle d'Ahmed et collaborateurs, montrant que l'injection unilatérale d'agrégats purifiés de tau, dans le cerveau de souris P301S induit, deux semaines post-injection, l'apparition de dégénérescences neurofibrillaires au site d'injection. Ensuite au cours du temps, les formes pathologiques de tau se propagent via les connections efférentes et afférentes au site d'injection dans des régions cérébrales neuro-connectées (Ahmed et al. 2014). Les travaux de Narasimhan ont également souligné l'importance et l'implication du réseau neuronal dans la propagation des tauopathies (Narasimhan et al. 2017). En effet, bien que l'injection d'extraits de cerveaux de patients atteints d'AD, PSP ou CBD soit associée à des phénotypes lésionnels distincts, la propagation spatiotemporelle des différentes lésions au sein des cerveaux semble emprunter des chemins identiques.

Les études décrites jusqu'à présent étaient principalement basées sur l'injection d'extraits de cerveaux. Il a été montré que l'injection de fibres recombinantes composées de protéines tau entières ou tronquées (de part et d'autre des domaines de liaison aux microtubules), était également en mesure d'induire l'apparition et la propagation de structures ressemblant à des DNFs dans des régions neuro-connectées (Iba et al. 2013; Peeraer et al. 2015; Stancu et al. 2015). Dans un de ces modèles, la propagation de la tauopathie dans les régions neuro-connectées est associée à l'apparition de déficits cognitifs (Stancu et al. 2015). Une telle corrélation entre la propagation de la tauopathie dans des

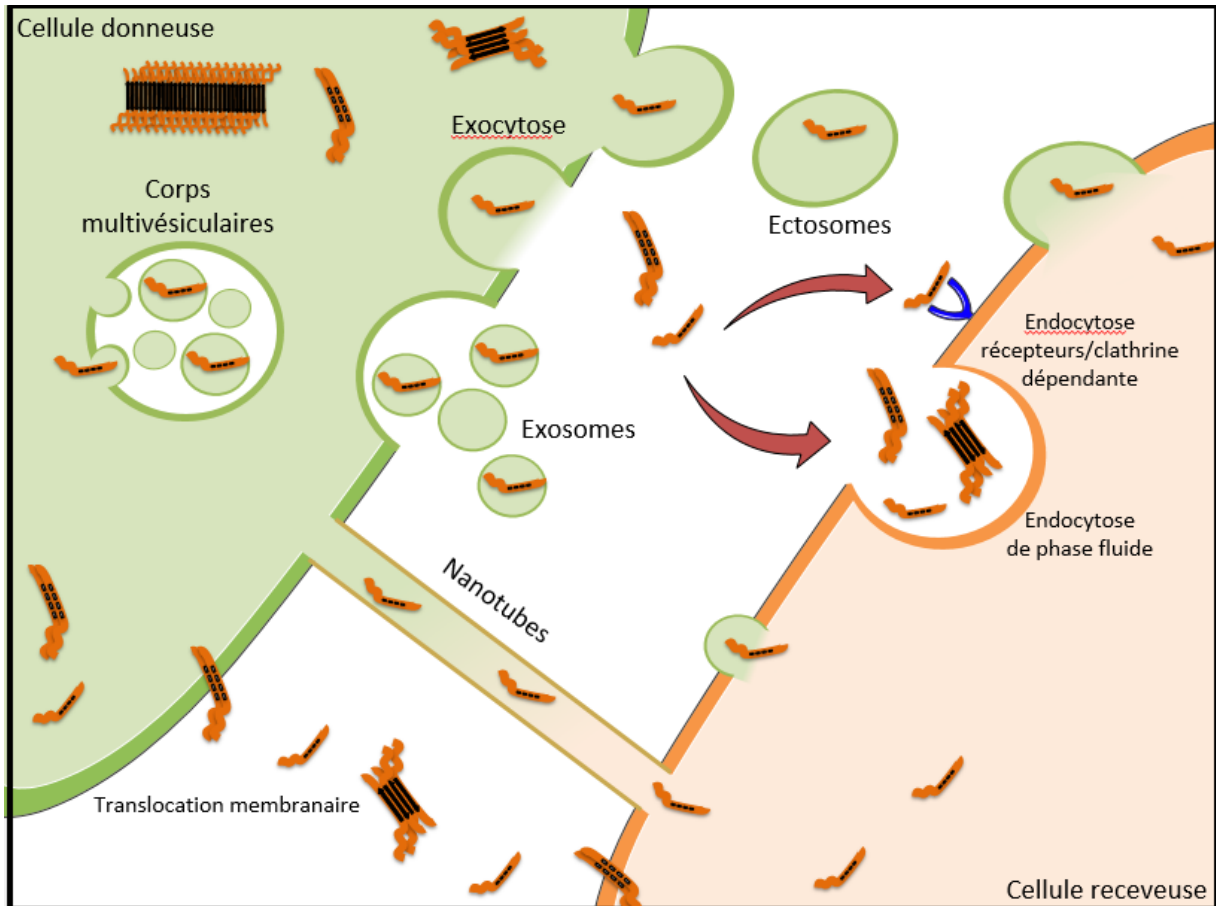
régions neuroconnectées et une évolution symptomatique, est très intéressante en vue de tester l'effet de traitements potentiels visant à bloquer la propagation des tauopathies. Enfin, les travaux Lasagna-Reeves ont montré que des oligomères de protéines tau, purifiés au départ de cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer, étaient également en mesure d'induire et de propager une conformation anormale dans le cerveau de souris non transgéniques (C. A. Lasagna-Reeves et al. 2012).

Bien que cette propagation inter-neuronale des tauopathies au sein de régions cérébrales neuroconnectées suggère une transmission trans-synaptique des formes pathologiques de tau, aucun de ces modèles *in vivo* ne démontre clairement cette hypothèse. Les seuls résultats tendant à confirmer cette transmission synaptique ont été obtenus *in vitro* et seront présentés dans le chapitre suivant décrivant les mécanismes sous-jacents à la transmission intercellulaire des formes pathologiques de la protéine tau. Notons que cette implication des synapses dans la propagation des tauopathies met en garde contre les stratégies thérapeutiques visant à restaurer les connections synaptiques, ce qui risquerait de favoriser la propagation de la pathologie (Calafate et al. 2015).

Bien que l'hypothèse de transmission trans-synaptique soit suggérée par de nombreuses études, il faut garder à l'esprit que bien souvent, dans les modèles présentés, la propagation de la tauopathie est également observée localement dans les régions au contact du site d'initiation de la pathologie, ce qui suggère aussi l'existence d'une propagation intercellulaire de proximité. Ce second mode de propagation serait en parfait accord avec les études démontant un transfert d'agrégats de tau médié par une sécrétion/capture dans le milieu extracellulaire (Frost, Jacks, and Diamond 2009; Kfoury et al. 2012; Wu et al. 2013). Ces deux hypothèses de propagation n'étant pas exclusives, il est probable qu'en réalité les deux modes de transmission opèrent et expliquent cette progression stéréotypique propre aux tauopathies. Sur base du connectome et de l'étude de la progression des lésions chez d'innombrables sujets, des équipes de recherche développent des modèles permettant de prédire mathématiquement l'évolution des tauopathies (Iturria-Medina and Evans 2015).

### III.4 Mécanismes sous-jacents à la transmission intercellulaire des protéines tau pathologiques

Avant de passer en revue l'ensemble des travaux ayant étudié les mécanismes de transfert impliqués dans la transmission intercellulaire des formes pathologiques et propagatives de tau, la figure 14 rappelle l'ensemble des mécanismes potentiellement impliqués dans ce transfert.



**Figure 15 : Mécanismes potentiellement impliqués dans la transmission intercellulaire des amorces de protéines tau pathologiques.** Une grande quantité de protéines tau pathologiques pourrait être libérée dans le milieu extracellulaire sous forme libre par un mécanisme d'exocytose ou de translocation membranaire. Ces formes libres pourraient pénétrer dans la cellule receveuse par translocation directe à la membrane, par endocytose en phase fluide ou par une endocytose clathrine et récepteurs-dépendante. Les amorces pourraient également être sécrétées sous forme vésiculaire, au sein d'exosomes (50-100 nm) ou d'ectosomes (100 à 1000 nm) qui pourront aisément entrer dans la cellule receveuse par fusion membranaire. Enfin, le transfert intercellulaire des protéines tau pathologiques peut également transiter via des nanotubes connectant directement les cytoplasmes des cellules donneuses et receveuses (Mudher et al. 2017).



### III.4.1 Transfert intercellulaire trans-synaptique

Calafate et ses collaborateurs ont montré que la transmission intercellulaire des protéines tau pathologiques était augmentée en présence de contacts synaptiques (Calafate et al. 2015). En effet, dans un réseau neuronal artificiel, en comparaison aux mécanismes de transfert non synaptiques, la présence de synapses et l'activité synaptique favorisent la propagation des formes pathologiques de tau. De plus, il a été montré que la libération présynaptique de glutamate (Yamada et al. 2014) ou l'activation des récepteurs AMPA (Pooler et al. 2013) était en mesure d'induire la sécrétion de la protéine tau via la libération de vésicules présynaptiques.

### III.4.2 Transfert intercellulaire médié par les exosomes

De par l'utilisation de chambres microfluidiques, Wang et collaborateurs ont mis en évidence un transfert trans-neuronal de la pathologie tau via **les exosomes**. Ce transfert serait augmenté par la dépolarisation des neurones de la chambre primaire et serait donc dépendant de l'activité neuronale ainsi que de la connectivité synaptique. Les exosomes seraient internalisés par les neurones et la microglie mais pas par les astrocytes (Y. Wang et al. 2017). En comparaison aux protéines tau intracellulaires, les protéines tau vésiculaires présentent un niveau de phosphorylation réduit (Polanco et al. 2016; Y. Wang et al. 2017). Les épitopes phospho-dépendants (AT8, AT100 et AT180) caractéristiques des formes pathologiques de tau ne sont pas détectés au sein des vésicules. Cependant, malgré un état hypophosphorylé en regard des protéines tau intracellulaires, les protéines tau exosomales conservent des propriétés d'agent de nucléation et sont en mesure d'induire l'agrégation de protéines tau intracellulaires en culture (Polanco et al. 2016; Y. Wang et al. 2017). Ce mode de transmission intercellulaire pourrait être essentiel pour la propagation des tauopathies. En effet, grâce à un modèle *in vivo* de propagation de tau basé sur l'injection de vecteurs associés aux adénovirus (AAVs) exprimant une forme mutée de la protéine, il a été montré que la déplétion en microglie ou l'inhibition de synthèse des exosomes permettait de réduire de manière très significative la propagation de la pathologie tau au sein du cerveau (Asai et al. 2015). Si la propagation intracérébrale des tauopathies résulte majoritairement d'un transfert intercellulaire médié par des exosomes, ceci sera un frein aux récentes stratégies thérapeutiques fortement orientées vers l'immunothérapie.

### III.4.3 Transfert intercellulaire médié par les nanotubes

**Les nanotubes** ont également été identifiés par notre laboratoire et l'équipe de Zurzolo comme des structures transitoires permettant la transmission intercellulaire de protéines tau agrégées. De manière très intéressante, il semblerait que le nombre de ces structures tubulaires augmentent significativement en présence de protéines tau agrégées dans le milieu extracellulaire (Tardivel et al. 2016; Abounit et al. 2016). A l'heure actuelle, ce mode de transmission intercellulaire n'a pas été observé *in vivo*. De ce fait, plusieurs chercheurs considèrent ces structures comme des artéfacts associés à la culture *in vitro*. Si ce mode de transfert venait à être confirmé, il ne serait également pas à la faveur des traitements immunothérapeutiques.

### III.4.4 Transfert intercellulaire médié par les protéoglycanes sulphatés

Récemment, il a été montré que le transfert intercellulaire de la protéine tau pouvait se faire par translocation directe au niveau des membranes plasmiques. L'hyperphosphorylation de la protéine tau provoquant son détachement des microtubules accroît la disponibilité de sa forme libre dans le cytoplasme. La protéine tau libre hyperphosphorylée irait alors se lier à la couche interne de la membrane plasmique avant de transloquer sur sa face externe, par le biais des **protéoglycanes sulphatés**. Ceci permettrait un transfert intercellulaire en mesure de provoquer l'apparition d'agrégats de protéines tau dans les cellules adjacentes (Katsinelos et al. 2018). Selon les travaux de Holmes, l'internalisation des protéines tau dans les cellules receveuses, serait également médiée par les **protéoglycanes héparane sulfate** (HSPGs) et se ferait par **micropinocytose** (B. B. Holmes et al. 2013). En 1990, les HSPGs ont déjà été associés à la propagation des protéines à prion (Snow et al. 1990). En effet, l'utilisation de polysulfate de pentosan en vue de bloquer la liaison de la protéine PrP<sup>Sc</sup> aux HSPGs présents à la surface cellulaire, permet de limiter la progression de prionopathies dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Tsuboi, Doh-Ura, and Yamada 2009). En raison de ces résultats précliniques prometteurs, le composé a été testé chez des patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et bien qu'il n'ait pas été en mesure de s'opposer à la détérioration du cerveau, le polysulfate de pentosan a permis de prolonger l'espérance de vie des patients (Brandon B. Holmes and Diamond 2014; Tsuboi, Doh-Ura, and Yamada 2009).

### III.4.5 Transfert intercellulaire médié par une sécrétion/capture dans le milieu extracellulaire

Au sein de notre équipe « Alzheimer & tauopathies », il a été montré que la protéine tau était sécrétée dans le milieu extracellulaire sous différentes formes mais majoritairement sous forme libre. Concernant les protéines tau vésiculaires, il semblerait que, bien que la protéine tau soit retrouvée au sein des exosomes, cette dernière est majoritairement sécrétée au sein des ectosomes (Dujardin, Bégard, et al. 2014). Dans la maladie d'Alzheimer, la libération de protéines tau dans le milieu extracellulaire serait accentuée par une exocytose anormale due à la dérégulation d'une protéine chaperonne CSP $\alpha$  (Tiwari et al. 2015).

Wu et collaborateurs ont montré que les agrégats de faibles poids moléculaires et les fibres recombinantes courtes peuvent être endocytées par les neurones adjacents et/ou neuro-connectés. L'**endocytose** des formes pathologiques de tau aurait lieu au niveau du compartiment somatodendritique ou au niveau des terminaisons axonales. L'internalisation aboutirait à un transport antérograde et/ou rétrograde responsable la progression de la tauopathie *in vivo* (Wu et al. 2013). Une internalisation n'est observée qu'à partir de trimères de protéines tau et est perdue en présence de longues fibres recombinantes ou de longs filaments natifs purifiés (Frost, Jacks, and Diamond 2009; Wu et al. 2013; Mirbaha et al. 2015). Une fois internalisés *in vitro* par endocytose, les agrégats ou fibrilles de protéines tau induisent la fibrillation de la protéine tau intracellulaire ce qui indique un transfert intercellulaire de la pathologie tau directement médié par le milieu extracellulaire (J. L. Guo and Lee 2011; Frost, Jacks, and Diamond 2009; Santa-Maria et al. 2012). Dans leur modèle, Falcon et ses collaborateurs ont montré que les protéines tau agrégées issues du cerveau de souris P301S ou des agrégats de protéines tau P301S recombinantes pouvaient également être internalisés par **macropinocytose** (Falcon et al. 2015).

Si ce mode de transfert, basé sur la sécrétion/capture d'espèces extracellulaires toxiques de tau sous forme libre est responsable de la propagation intracérébrale des tauopathies, nous avons beaucoup à attendre et à espérer des nombreux essais cliniques d'immunothérapies actuellement en essai clinique de phase 2.

### III.4.6 Facteurs influençant ou participant à la sécrétion de la protéine tau

En plus de l'activité neuronale ou synaptique, il semblerait que la phosphorylation puisse également favoriser la sécrétion des protéines tau. Les travaux de Plouffe et ses collaborateurs ont montré que la protéine tau sécrétée était déphosphorylée sur plusieurs sites en comparaison avec la protéine intracellulaire qui présente une forte immunoréactivité pour de nombreux anticorps phospho-dépendants. Cette mise en évidence du caractère partiellement déphosphorylé des formes sécrétées est plutôt surprenant compte tenu du fait, que l'hyperphosphorylation semble favoriser la sécrétion de tau. En effet, mimer la phosphorylation de la protéine tau en 12 sites reconnus pour être phosphorylés dans la maladie d'Alzheimer augmente sa sécrétion (Plouffe et al. 2012). La sécrétion extracellulaire de tau, sous des formes hypophosphorylées, pourrait directement dépendre ou être favorisée par une hyperphosphorylation des protéines tau intracellulaires.

Kim et ses collaborateurs ont montré la présence indispensable de certains domaines de la protéine tau, tel le domaine de projection N-terminal pour la sécrétion de la protéine. Dans leur modèle *in vivo*, la sécrétion de tau aboutit à la formation de 2 types de dépôts extracellulaires : les dépôts focaux entourant les terminaisons nerveuses et les dépôts diffus évoluant en gradient autour du corps cellulaire. L'apparition des dépôts focaux semble nécessiter un domaine C-terminal fonctionnel. Au contraire, la sécrétion des protéines tau impliquées dans les dépôts diffus semble favorisée par une inactivation ou clivage du domaine C-terminal. Dans un modèle *in vitro* de surexpression de la protéine tau, Plouffe et ses collaborateurs, montrent que le clivage en l'extrémité C-terminale de la protéine tau, (tau tronquée en D421) favorise sa sécrétion (Plouffe et al. 2012). Enfin la présence de la mutation pathologique P301L semble augmenter la sécrétion des protéines tau, aboutissant à des dépôts extracellulaires focaux plus conséquents et une dégénérescence dendritique locale (Kim et al. 2010).

### *III.5 Différentes souches de protéines tau pathologiques associées à des profils de tauopathies distincts*

*L'étape suivante fut de regarder si, en comparaison aux prionopathies, les différentes tauopathies peuvent également être considérées comme des souches distinctes, capables d'induire l'apparition de profils lésionnels et évolutifs différents, reproductibles sur plusieurs générations.*

***In vitro***, il a été montré que les fibres de protéines tau naïves purifiées présentent un pouvoir de recrutement et de nucléation supérieur aux fibres recombinantes, probablement en raison de différences conformationnelles entre ces deux types de fibres. Des fibres recombinantes, produites au départ d'amorces fibrillaires natives présentent des propriétés agrégatives supérieures à celles de

fibres recombinantes, composées de protéines tau similaires, mais initiées au départ d'amorces fibrillaires synthétiques. Ces observations indiquent une conservation et une transmission fidèle des caractéristiques de l'amorce initiale au cours de l'élongation (Falcon et al. 2015; J. L. Guo et al. 2016). De plus, en culture, l'expression des domaines de répétition de la protéine tau sous différentes conformations se propage à l'identique et ce, même lors d'une réintroduction au contact de cellules naïves. Deux de ces souches pathologiques produites *in vitro*, ont induit *in vivo*, l'apparition de deux pathologies distinctes et reproductibles, successivement sur trois générations de souris transgéniques. La purification des protéines tau pathologiques apparues dans le cerveau de ces souris, suivie d'une incubation au contact de cellules naïves induit la réapparition des deux souches initiales en culture. L'ensemble de ces résultats *in vitro* et *in vivo* soutiennent l'hypothèse que les tauopathies sont associées à différentes souches de protéines tau pathologiques qui expliqueraient les phénotypes typiques et caractéristiques propres à ces maladies neurodégénératives (Sanders et al. 2014).

Une année avant cela, l'équipe de Florence Clavaguera a été la première à montrer *in vivo* que l'injection d'extraits de cerveaux issus de différentes tauopathies (AD, TD, AGD, PSP, CBD et PiD) dans le cerveau de souris ALZ17 surexprimant une forme sauvage de la protéine tau (2N4R), induit l'apparition d'inclusions argyrophiles de protéines tau dont le profil lésionnel est en parfait accord avec l'extrait cérébral injecté. Des inclusions similaires ont été également observées suite à l'injection de ces mêmes extraits dans le cerveau de souris non-transgéniques (Clavaguera et al. 2013). Une fois purifiés, ces agrégats aux différents phénotypes peuvent être ré-injectés dans le cerveau de souris ALZ17 naïves et y induire l'apparition d'agrégats aux profils identiques (Clavaguera et al. 2013). Ces résultats démontrent que la nature des amorces pathologiques de tau est déterminante pour les caractéristiques structurales des agrégats résultants.

En plus de présenter des phénotypes lésionnels différents, la maladie d'Alzheimer (AD) et la dégénérescence corticobasale (CBD) présentent une spécificité cellulaire et une topographie des lésions distinctes. Après l'injection d'extraits cérébraux issus de ces deux maladies neurodégénératives dans le cerveau de souris non transgénique (Narasimhan et al. 2017) ou souris surexprimant une forme mutée de tau (Boluda et al. 2015; Kaufman et al. 2016), les tauopathies résultantes ont été observées en majorité dans des oligodendrocytes pour l'extrait de CBD et dans les neurones pour l'extrait d'AD, démontrant une conservation de la spécificité cellulaire entre les différentes souches. Le profil de propagation des deux tauopathies au départ d'un même site d'injection semble emprunter le même réseau neuronal malgré une vitesse de progression et une agressivité des pathologies résultantes qui diffèrent et expliquent les caractéristiques cliniques et pathologiques distinctes associées à ces tauopathies.

Il a été également montré que le ratio des isoformes de tau 3R/4R de l'amorce, peut affecter la vitesse de progression et de propagation de la tauopathie. En effet, une tauopathie plus robuste sera observée en présence d'isoformes identiques (Woerman et al. 2016). Enfin, les propriétés morphologiques et propagatives associées aux différentes souches ont été directement reliées à leur degré et profil de phosphorylation. En effet, l'injection intracérébrale dans le cerveau de souris transgéniques htau, d'extraits de cerveaux AD dont le contenu protéique a été déphosphorylé par la phosphatase-2A, résulte en une perte de l'apparition étendue de dégénérescences neurofibrillaires au profit de l'apparition localisée de grains argyrophiles (Hu et al. 2016).

### *III.6 Forme(s) toxique(s) impliquée(s) dans la propagation*

Bien que l'ensemble des études présentées atteste d'une propagation intercellulaire des tauopathies, actuellement, nous ne sommes pas en mesure de définir avec certitude les espèces toxiques directement impliquées dans la propagation. Cependant, en regroupant toutes les informations disponibles, il est possible d'émettre des hypothèses à ce sujet.

*In vitro*, il a été montré qu'avant de former des fibres, la protéine tau formait des agrégats de faibles poids moléculaires qui, comme les fibres recombinantes courtes, sont en mesure d'être internalisés. Cette internalisation n'est pas observée en présence de monomères, de fibres recombinantes longues ou de longs filaments natifs purifiés (Wu et al. 2013; Frost, Jacks, and Diamond 2009). Quelques années plus tard, il a été montré que la taille minimale pour observer une internalisation cellulaire était un trimère. Quant à l'internalisation cellulaire optimale, elle est observée en présence de décamères de protéines tau. Si l'on s'intéresse aux propriétés d'amorces, les polymères plus importants présentent une meilleure capacité de recrutement (Mirbaha et al. 2015). Récemment, ce même laboratoire a apporté de nouveaux résultats très intéressants montrant que la capacité de recrutement des protéines tau pathologiques pourrait uniquement dépendre de l'accessibilité, dans la conformation tridimensionnelle, aux peptides pro-agrégatifs PHF6 (306-VQIVYK-311) (M. von Bergen et al. 2000) et PHF6\* (275-VQIINK-280) (Martin Von Bergen et al. 2001), présents au sein des domaines de répétition. Ils démontrent qu'en cas d'accessibilité conformationnelle du peptide, même un monomère est en mesure de présenter des fonctions d'agent de nucléation (Mirbaha et al. 2018b). Sur base de ces résultats, les formes toxiques de tau participant activement à la propagation sont probablement le fruit d'un équilibre entre une transmission intercellulaire efficace en conservant des propriétés agrégatives optimales. De par leur internalisation plus conséquente, les oligomères de tau et/ou les fibres courtes pourraient participer activement à la propagation de la pathologie. Il est également apparu que les fibres synthétiques, probablement en raison de leur structure tridimensionnelle différente, avaient un pouvoir agrégatif et une capacité de propagation réduits en comparaison aux

fibres natives (Falcon et al. 2015; J. L. Guo et al. 2016). Cette différence pourrait également s'expliquer du fait de la présence, au sein des extraits de cerveaux enrichis en agrégats, d'espèces agrégées de tau de petits poids moléculaires, plus aptes à la propagation que les fibres synthétiques de haut poids moléculaires.

En comparaison aux espèces intracellulaires, les formes sécrétées de tau seraient hypophosphorylées (Polanco et al. 2016; Y. Wang et al. 2017). Pourtant, la phosphorylation intracellulaire de la protéine tau semble être associée à une augmentation de sa sécrétion (Kim et al. 2010). Le fait que les espèces potentiellement propagatives soient hypophosphorylées est également surprenant, du fait que la déphosphorylation intensive de protéines tau pathologiques, abolit les propriétés d'amorces (Hu et al. 2016). Cependant, il a été montré, que malgré leur état hypophosphorylé en certains sites pathologiques, les protéines tau sécrétées conservent leurs capacités agrégatives. Il semblerait donc que seulement une partie des sites d'hyperphosphorylation soient requis et indispensables pour assurer les propriétés d'amorces des protéines tau pathologiques (Brandon B. Holmes and Diamond 2014).

Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine tau subit de nombreuses troncations qui augmentent, son hyperphosphorylation, ses propriétés agrégatives ou encore sa capacité/vitesse de propagation (Basurto-Islas et al. 2008; J.-H. Cho and Johnson 2004; Matsumoto et al. 2015). Par conséquent, il est envisageable que des formes tronquées de la protéine tau participent activement à la propagation des tauopathies.

Barthélémy et Sato se sont énormément intéressés aux formes extracellulaires humaines de la protéine tau contenues dans le LCR et ont montré que les patients contrôles et les patients atteints de tauopathies présentaient des profils peptidiques similaires en spectrométrie de masse, à l'exception d'un nombre de peptides 3 à 4 fois plus élevé chez les malades (Barthélémy, Gabelle, et al. 2016). Leurs travaux ont également montré qu'au sein du cerveau, un quart des protéines tau intracellulaires étaient tronquées en l'extrémité C-terminale, après le résidu 267. Dans le LCR, les protéines tau libres semblent systématiquement tronquées (>99.99%). Le site de clivage principal de ces protéines tau libres semble avoir lieu entre les acides aminés 222/225 et, dans une moindre mesure, également après le résidu 267 (Sato et al. 2018). Une autre étude semble positionner le site de clivage principal un peu plus en retrait, après le peptide 243-254 (Bros et al. 2015). Une information qui ressort également de ces travaux est l'absence de détection des peptides spécifiques des isoformes 2N et des peptides relatifs aux domaines de liaison aux microtubules, au sein des espèces extracellulaires de tau présentes dans le LCR (Barthélémy, Fenaille, et al. 2016).

Dans leurs derniers travaux, Barthélémy et Sato ont mis en évidence, qu'à un stade où la pathologie amyloïde est détectée mais qui précède l'apparition des protéines tau agrégées, une production et sécrétion importante de protéines tau tronquées sont observées. Ceci suggère une implication potentielle des formes sécrétées et tronquées, dans le développement des tauopathies (Sato et al. 2018). Toujours dans le LCR, Senguta et collaborateurs ont mis en évidence des formes oligomériques de protéines tau chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Sengupta et al. 2017).

En résumé, les espèces toxiques de tau, participant activement à la propagation de la tauopathie, sont probablement des formes de petits poids moléculaires, potentiellement tronquées et dans un état pré-pathologique (impliquant une conformation pro-agrégante) et partiellement phosphorylé.

Cette hypothèse est en accord avec des résultats obtenus au sein de notre équipe « Alzheimer & tauopathies ». Lorsque l'on injecte en intracérébral un vecteur lentiviral codant pour la protéine tau humaine sauvage (1N4R), on observe le développement d'une tauopathie AT8, MC1 et AT100 positives dans les régions avoisinant le site d'injection mais également une propagation d'une tauopathie AT8 positive dans une région neuro-connectée distante. Lorsque l'on injecte de manière similaire un vecteur lentiviral codant pour la protéine pro-agrégante tau P301L, on observe également le développement d'une tauopathie AT8, MC1 et AT100 positives dans la région du site d'injection mais contre toute attente, une perte de la propagation dans les régions neuro-connectées. Une explication potentielle en regard de cette inhibition de la propagation de la tauopathie en présence de protéines tau P301L serait la capacité agrégative plus importante des protéines tau mutée. Une fois exprimées dans les neurones, les protéines tau mutées risquent de rapidement s'hyperphosphoryler, s'agréger et former des structures AT8, MC1 et AT100 positives, moins propices à la propagation des tauopathies. De plus, il a été montré qu'en réponse à l'hyperphosphorylation, la protéine tau, habituellement retrouvée dans les projections axonales, est rapatriée vers le compartiment somatodendritique, pour y former des agrégats intracellulaires qui interfèrent avec le transport axonal et la transmission synaptique ce qui peut également expliquer cette absence de propagation de la tauopathie en présence de la forme mutée de tau (Yang et al. 2007; Hoover et al. 2010).



## **CHAPITRE 4 : Immunothérapie dirigée contre la protéine tau**

### **I. Avantages et inconvénients**

Jusqu'à présent, les stratégies thérapeutiques étudiées en vue de stopper la progression des tauopathies cherchent à inhiber les kinases ou activer les phosphatases impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau (inhibiteurs de GSK-3 : lithium / tideglusib) (Del Ser et al. 2013), à prévenir l'agrégation de la protéine tau (bleu de méthylène et dérivés) (Allal Boutajangout and Wisniewski 2014; Gauthier et al. 2016) et enfin, à dégrader les protéines tau pathologiques via le protéasome ou l'immunothérapie. Malheureusement, lors des essais cliniques, la plupart de ces approches thérapeutiques ne parviennent pas à empêcher l'évolution des symptômes chez les patients.

Compte tenu du transfert intercellulaire des protéines tau pathologiques, l'immunothérapie semble intéressante en vue de bloquer la propagation des tauopathies. De plus, au vu de leur caractère hautement sélectif envers leur cible, leurs propriétés pharmacocinétiques et leur toxicité systémique faible (Rüb et al. 2017), les traitements immunothérapeutiques sont devenus l'une des approches principales dans la recherche de traitements contre la maladie d'Alzheimer.

Jusqu'à présent, au vu de l'hypothèse de la cascade amyloïde, la majorité des équipes de recherche ayant utilisé l'immunothérapie en vue de bloquer la progression de la maladie d'Alzheimer, ont pris pour cible, le peptide amyloïde bêta. Ces études ont montré une baisse significative des dépôts amyloïdes (Bard et al. 2000; Schenk et al. 1999) ainsi qu'une diminution du déclin cognitif dans des modèles Alzheimer murins (Janus et al. 2000; Morgan et al. 2000). Wilcock et collaborateur ont également montré que dans leurs modèles une vaccination dirigée contre le peptide amyloïde était en mesure de réduire la pathologie tau (Wilcock et al. 2006). Compte tenu de ces résultats précliniques prometteurs, des essais cliniques d'immunothérapies passives et actives ciblant le peptide A $\beta$  ont vu le jour. Malheureusement, certains d'entre eux ont été arrêtés en raison de leur inefficacité (Salloway et al., 2014) ou toxicité (Orgogozo et al. 2003; Lobello et al. 2012; Panza et al. 2014). Ce manque d'efficacité pourrait provenir de la présence confirmée de symptômes mnésiques au moment de la mise en place des traitements immunothérapeutiques. Bien qu'il est envisageable que ces traitements dirigés contre le peptide amyloïde beta seraient d'une plus grande efficacité dans des stades plus précoces de la maladie d'Alzheimer ; dans les phases symptomatiques, il semblerait que cibler uniquement le peptide A $\beta$  ne soit pas suffisant pour s'opposer à l'évolution du déclin cognitif. Une étude menée sur un modèle de souris Alzheimer développant les deux aspects de la démence a d'ailleurs montré que l'immunothérapie anti-A $\beta$  n'avait aucun effet sur la tauopathie et le déclin

cognitif (Oddo et al., 2006). Cette incapacité à affecter la tauopathie en ciblant le peptide A $\beta$  (Vandenberghe et al. 2016), associée à la corrélation entre la progression symptomatique de la maladie d'Alzheimer et l'évolution des dégénérescences neurofibrillaires (DNF), sous-entend la nécessité de cibler et de réduire la pathologie tau en vue de bloquer l'évolution du déclin cognitif (Nelson et al. 2012).

Les résultats décevants de l'immunothérapie dirigée contre le peptide amyloïde  $\beta$  ont conduit les équipes de recherche à se recentrer sur une immunothérapie ciblant la protéine tau. En diminuant la tauopathie, une réduction du déclin cognitif devrait être observée, qui est contrairement aux dépôts amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, corrèle avec l'évolution des dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) (Nelson et al. 2012).

### *1.1 Challenges de l'immunothérapie*

Aujourd'hui encore, les traitements immunothérapeutiques font face à plusieurs challenges (Cynis et al. 2016). Premièrement, seul un faible pourcentage des anticorps ( $\sim 0,1\%$ ) traverse la barrière hémato-encéphalique. Il sera donc peut être nécessaire d'augmenter l'accessibilité des anticorps au cerveau, pour observer les effets désirés. En cas de besoin, l'utilisation d'anticorps plus pénétrants (scFvs (Ahmad et al. 2012)) ou fusionnés à des protéines chaperonnes (Spencer et al. 2018), l'utilisation de vecteurs lentiviraux codant pour l'anticorps (W. Liu et al. 2016; Ising et al. 2017a; Spencer et al. 2018), l'induction d'ouvertures transitoires de la BHE à l'aide d'ultrasons (Nisbet, Van der Jeugd, et al. 2017) ou encore l'implantation cérébrale de pompes à libération contrôlée d'anticorps (Yanamandra et al. 2013a), ont, d'ores et déjà, été envisagées. Cependant, au vu des problèmes d'intégrité de la BHE observés chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, il se peut que ce problème soit naturellement résolu. En effet, la perte de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique chez ces patients pourraient permettre un meilleur accès des IgG périphériques au système nerveux central (SNC) (Bowman et al. 2007).

Deuxièmement, la maladie d'Alzheimer s'installe et progresse pendant plusieurs années, voire plusieurs décennies avant l'apparition des premiers symptômes. Ceci implique que les essais cliniques d'immunothérapies passives et actives décrits à ce jour, ont été réalisés à un moment, où des dommages neuronaux conséquents étaient déjà présents. Ceci pourrait, en partie, expliquer l'absence d'effet des différents traitements testés jusqu'à présent, sur l'évolution des déficits cognitifs. Afin de pouvoir anticiper les essais cliniques, en vue de les rendre plus pertinents, le développement de biomarqueurs précoces et sensibles est essentiel. Les patients pourraient être pris en charge plus

rapidement et traités sur de plus longues périodes, ce qui devrait faciliter l'étude et améliorer l'efficacité des traitements.

Troisièmement, des études complémentaires seront nécessaires afin de définir le mécanisme d'action et le mode de clairance des complexes anticorps-antigène en vue d'éviter la saturation des voies d'élimination lors de traitements à long terme. Les anticorps testés jusqu'à présent semblent pouvoir interagir à la fois avec les protéines tau intra et extracellulaires. A l'heure actuelle, bien que les formes extracellulaires semblent directement impliquées dans la propagation, il n'a pas encore été démontré que le ciblage de ces formes en particulier permettait de bloquer plus efficacement la progression de la pathologie (Sigurdsson et al., 2016).

On distingue deux types d'immunothérapies : l'immunothérapie active et passive présentant toutes deux, des avantages et des inconvénients respectifs.

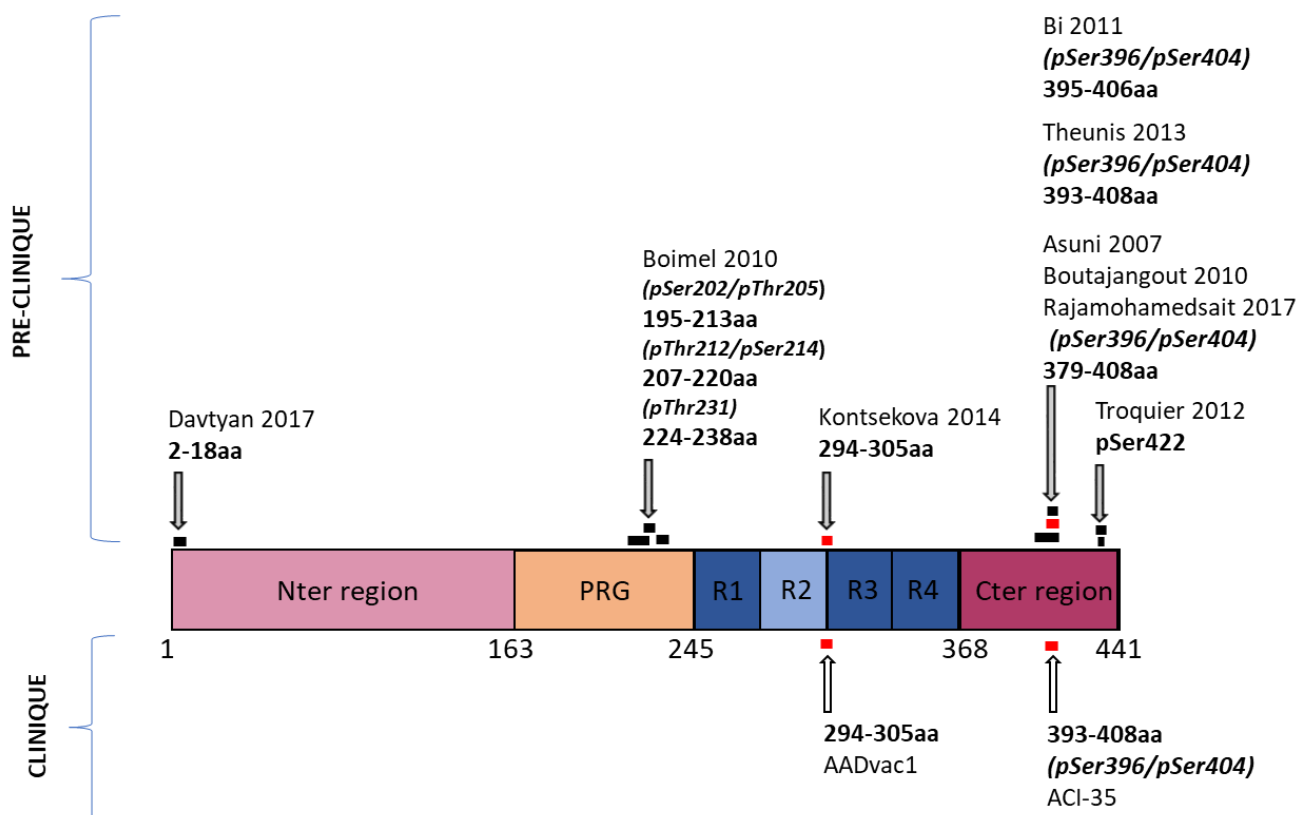
## **II. Immunothérapie active**

La vaccination active est connue pour stimuler le système immunitaire cellulaire et humoral du patient en vue de promouvoir la production d'anticorps dirigés contre un antigène donné. Cette immunisation active consiste en l'injection de l'antigène associé à un adjuvant immunostimulant. Le principal avantage de la vaccination est son accessibilité et l'induction d'une production d'anticorps à long terme. Si elle est efficace, l'immunothérapie active peut être considérée comme un traitement peu invasif et rentable (Lemere and Masliah 2010; Cynis et al. 2016).

Il faut cependant garder à l'esprit que la vaccination active implique une activation des cellules T ce qui augmente le risque d'une réponse immunitaire délétère causée par la libération de cytokines pro-inflammatoires (observé en présence d'un adjuvant trop fort et/ou pro-inflammatoire). Enfin, l'immunothérapie active conduit à la production d'anticorps polyclonaux reconnaissant des épitopes multiples qui se chevauchent sur la protéine cible. Cette large couverture de reconnaissance peut être considérée comme un avantage considérable mais peut également devenir un inconvénient lorsque l'antigène est une forme pathologique d'une protéine intrinsèque ayant des fonctions physiologiques majeures. En effet, il est possible qu'une partie des anticorps produits soit en mesure de reconnaître la forme physiologique, au risque d'induire une réaction auto-immune aux conséquences potentiellement désastreuses. Rosenmann et ses collaborateurs ont d'ailleurs montré que l'immunisation active de souris sauvages (C57BL/6) avec une protéine tau humaine recombinante provoquait le développement d'encéphalomyélites confirmant le risque potentiel de vaccins dirigés contre la forme physiologique de la protéine tau (Rosenmann et al. 2006). Bien que ce risque soit

présent, il faut garder à l'esprit que cette vaccination a été réalisée sur des souris sauvages ne présentant aucun signe de tauopathie. Une vaccination similaire sur souris souffrant de tauopathies n'engendrerait pas forcément ces effets secondaires néfastes. Les tauopathies touchant principalement des sujets âgés, une variabilité et une moindre efficacité de la réponse immunitaire sont à craindre et doivent être prises en considération.

Avant de décrire ces travaux plus en détails dans les points ci-dessous, la figure 16 présente les différentes épitopes (et papiers récapitulatifs associés) ayant, à ce jour, été testés en immunothérapie active dans des études précliniques, en comparaison aux épitopes actuellement testés en essais cliniques chez l'homme.



**Figure 16 : Bilan des études précliniques et cliniques réalisées à ce jour en immunothérapie active.** Les épitopes/peptides de la protéine tau, ayant été ciblés par immunothérapie active dans des études précliniques, sont présentés en regard des vaccins actuellement testés en essais cliniques chez l'homme. Au-dessus de chaque épitope, se trouve la référence du papier dans lequel les résultats de l'immunothérapie active réalisée au départ de ce peptide, ont été publiés. Lorsqu'il s'agit d'un peptide phospho-dépendant, les sites de phosphorylations sont précisés en écriture italique.

## II.1 Études précliniques

La première étude, ayant montré une efficacité potentielle de la vaccination active dirigée contre la protéine tau en vue de s'opposer à l'évolution des tauopathies, fut réalisée en 2007 par Asuni et ses collaborateurs. L'immunisation active avec un peptide (tau 379-408) comprenant les résidus phosphorylés pSer396 et pSer404 dans un modèle de souris transgéniques P301L, a été associée à une réduction significative des agrégats de protéines tau ainsi qu'à un ralentissement de l'apparition des déficits moteurs sans signe de toxicité auto-immune (Asuni et al. 2007b). Quelques années plus tard, l'immunisation avec ce même peptide a été en mesure d'empêcher l'apparition de déficits cognitifs sévères dans un autre modèle transgénique murin de tauopathie (htauXPS1) (A. Boutajangout, Quartermain, and Sigurdsson 2010). Dans ce même article, il a été montré que les anticorps polyclonaux produits après l'administration du vaccin reconnaissent également le peptide 379-408 non-phosphorylé. Plus récemment, ce vaccin a été testé chez les souris 3xTg-AD, un modèle de pathologie Alzheimer, développant simultanément une tauopathie et une pathologie amyloïde. Dans ce modèle, le peptide 379-408 (pSer396/pSer404) permet une réduction de 70% de protéines tau agrégées, mais également une réduction de plus de 80% des dépôts amyloïdes. Cette immunisation active serait également associée à une diminution de la microglie et des microhémorragies (Rajamohamedsait et al. 2017).

En 2013, Theunis et ses collaborateurs étudièrent l'effet d'un vaccin anti-tau composé d'un peptide plus petit (393-408) comportant également les résidus Ser396 et 404 phosphorylés et dont la délivrance est médiée par des liposomes. L'administration de ce vaccin semble induire un retard dans l'émergence des déficits moteurs ainsi qu'une diminution de la protéine tau phosphorylée au niveau du résidu pSer396 (contrairement aux formes phosphorylées sur les résidus 404 ou 231 dont le niveau reste inchangé). Dans ce modèle, les anticorps polyclonaux produits semblent phospho-dépendants de par une reconnaissance significativement plus importante du peptide et de la protéine tau phosphorylée (pSer396 et pSer404). Cette spécificité envers les sites de phosphorylation ciblés est probablement à mettre en lien avec la taille réduite du peptide (16 aa) en comparaison avec celui du vaccin précédemment étudié (30 aa). Ce vaccin a atteint les essais cliniques sous le nom d'ACI-35 (Theunis et al. 2013).

A notre connaissance un dernier vaccin impliquant le double site de phosphorylation pSer396 et pSer404 a été testé par Bi et collaborateurs. Le peptide s'étend des résidus 395 à 406 et son administration permet de diminuer les protéines tau pathologiques et agrégées ainsi que le nombre de neurones en dégénérescence neurofibrillaire au sein du cerveau de souris P301L (Bi et al. 2011).

L'efficacité potentielle de la vaccination active a été également confirmée en ciblant d'autres sites de phosphorylation comme la pSer422. En effet, notre équipe « Alzheimer & tauopathies », il a montré que l'immunisation avec des peptides incluant le site de phosphorylation pathologique pSer422 permettait une diminution des protéines tau pathologiques et agrégées ainsi qu'une amélioration des fonctions cognitives. Il fut également montré que les anticorps produits au départ d'un peptide d'une taille de 7 aa produisait des anticorps spécifiques des formes phosphorylées (pSer422), contrairement aux anticorps produits au départ d'un peptide de 11 aa pouvant à la fois reconnaître la forme phosphorylée (pSer422) et non phosphorylée (Ser422) du résidu.

L'étude d'immunisation active de Boimel et collaborateurs se base sur l'injection de 3 peptides contenant plusieurs sites de phosphorylation systématiquement observés dans la maladie d'Alzheimer : Tau195-213 [pSer202/pThr205], Tau207-220 [pThr212/pSer214] and Tau224-238 [pThr231]. L'administration de ce vaccin tri-peptidique résulte en une baisse significative des dégénérescences neurofibrillaires et en une augmentation des dépôts dans la microglie sans signe d'encéphalite. Les anticorps produits au départ de ce vaccin ciblent essentiellement la protéine tau hyperphosphorylée sur les sites utilisés pour l'immunogénéisation et ne semble pas reconnaître la protéine tau entière (Boimel et al. 2010).

Un vaccin à ADN, contenant un plasmide codant pour trois copies non phosphorylées de l'épitope N-terminal de la protéine tau 2-18 a été également testé. Sous une forme physiologique, cette région N-terminale de la protéine tau n'est pas supposée être accessible, ce qui implique que la protéine tau physiologique ne devrait pas être reconnue par les anticorps produits suite à l'injection du vaccin. Lors de l'acquisition d'une conformation pathologique, cet épitope N-terminal de la protéine tau se retrouverait exposé et pourrait, de ce fait, être reconnu par les anticorps. Seulement, suite à l'immunothérapie active, il semblerait que seules les protéines tau non-phosphorylées aient été significativement réduites (Davtyan et al. 2017).

Une étude a comparé l'immunisation active de souris transgéniques (rTg4510) ou non, au départ d'une protéine tau entière sauvage ou mutée en P301L. Une diminution des protéines tau phosphorylées en les résidus Ser202/Thr205 (AT8), de l'inflammation et des dépôts dans la microglie ont été observés. De plus la comparaison des épitopes des anticorps produits suite à l'injection de la protéine tau sauvage, versus la protéine mutée, a permis de définir cinq épitopes uniquement retrouvés en cas d'injection de la forme mutée. Il s'agit, à l'extrémité N-terminale des résidus 9-15 et 21-27, dans le domaine riche en proline des résidus 168-174 et 220-228, et dans l'extrémité C-terminale, les résidus 427-438 (Selenica et al. 2014).

L'équipe de Kontsekova et collaborateurs a montré que l'anticorps DC8E8, reconnaissant la séquence « HXPGGG », est en mesure d'inhiber l'oligomérisation des protéines tau *in vitro* (Kontsekova, Zilka, Kovacech, Skrabana, et al. 2014). Un vaccin composé d'un peptide synthétique dérivé des acides aminés 294 à 305 (KDNKHVPGGGS), incluant cette séquence « HXPGGG », retrouvée dans chacun des domaines de liaisons aux microtubules a alors été développé. L'administration de ce vaccin, résulte en une diminution des protéines tau agrégées et des dégénérescences neurofibrillaires ainsi qu'en une amélioration des fonctions sensori-motrices. Ce vaccin, baptisé AAD-vac1, a été le premier vaccin dirigé contre la protéine tau à entrer en essais cliniques chez l'homme (Kontsekova, Zilka, Kovacech, Novak, et al. 2014b).

La dernière étude préclinique d'immunisation active consiste en l'injection de PHFs humains chez des souris transgéniques THY-tau22. Cette vaccination a été associée à une diminution des protéines tau insolubles fibrillaires sans signe d'inflammation (Ando et al. 2014).

Dans la plupart des cas, la réduction significative des protéines tau pathologiques ne s'accompagne pas d'effets indésirables ce qui fait de l'immunisation active dirigée contre la protéine tau, un traitement potentiel prometteur. Cependant, la production d'anticorps contre la protéine tau physiologique implique le risque de développer une réaction immunitaire délétère. Ce fut notamment le cas chez des souris, où, en présence d'adjuvants puissants, la vaccination contre la protéine tau a été associée à une toxicité. L'utilisation de tels adjuvants n'est heureusement pas autorisée chez l'homme. La vaccination en présence de peptides immunogéniques similaires, avec un adjuvant plus léger, n'est d'ailleurs pas associée à ces effets indésirables (Selenica et al. 2014). Ces études soulignent l'importance du choix des adjuvants lors de l'élaboration de vaccins (Asuni et al. 2007b).

Gardons toute fois à l'esprit, que la variabilité et faiblesse de la réponse immunitaire observée chez les sujets âgés, reste un obstacle envers la vaccination active pour le traitement des tauopathies.

## *II.2 Études cliniques*

Le premier vaccin anti-tau ayant atteint les essais cliniques est **AADvac1** (Axon Neuroscience, Bratislava, Slovaquie). Il s'agit d'un peptide synthétique dérivé des acides aminés 294 à 305 (KDNKHVPGGGS), comportant la séquence « HXPGGG » retrouvée dans les domaines de liaisons aux microtubules. Le vaccin se compose du peptide, couplé à l'hémocyanine de patelle et est administré avec un adjuvant à base d'alum. Dans un premier temps, l'effet de trois doses d'AADvac1 (à raison d'une injection par mois) a été évalué chez une trentaine de patients atteints de maladies d'Alzheimer légères à modérées, afin de vérifier l'innocuité, la tolérance et l'efficacité du vaccin (identifiant ClinicalTrials.gov: NCT01850238) (Novak et al. 2017). Les effets indésirables les plus fréquents furent de petites réactions au site d'injection. Aucune réaction immunitaire délétère, de méningo-

encéphalite ou d'œdème ne fut observé. Deux patients ont quitté l'étude pour raison médicale, sans pouvoir relier les problèmes observés à l'administration du vaccin. Dans cette première étude réalisée chez l'homme, AADvac1 a montré un profil d'innocuité favorable et une excellente immunogénicité. Cet essai clinique a été poursuivi par une phase ouverte, au cours de laquelle, tous les patients ont reçu trois autres doses de vaccin mais à ce jour, peu d'informations sont disponibles sur cette seconde phase (Novak et al. 2017). S'ils le souhaitent, une extension ouverte de 18 mois a été également proposée aux patients. (identifiant ClinicalTrials.gov: NCT02031198, FUNDAMANT). Actuellement, une étude clinique indépendante de phase II, basée sur l'injection de onze doses de vaccins sur une durée de 24 mois, est également en cours chez des patients souffrant de stades légers de la maladie d'Alzheimer, (identifiant ClinicalTrials.gov: NCT02579252, ADA-MANT) (Kontsekova, Zilka, Kovacech, Novak, et al. 2014a; Panza et al. 2016; Novak et al. 2017). Au terme de cette étude, l'innocuité du vaccin, les modifications des symptômes cliniques ainsi que le niveau des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer dans le sang et le LCR seront évalués.

Le second vaccin anti-tau, **ACI-35** (AC Immune AG et Janssen Pharmaceuticals) a été testé dans une étude clinique de phase Ib. Il s'agit d'un peptide (393-408) dont la délivrance est médiée par des liposomes comprenant les résidus Ser396 et Ser404 phosphorylés. Cet essai clinique compare l'effet de deux doses d'ACI-35 chez des personnes souffrant de maladies d'Alzheimer légères à modérées, en vue d'étudier l'innocuité, la tolérance et l'immunogénicité du vaccin (Panza et al. 2016; Theunis et al. 2013).

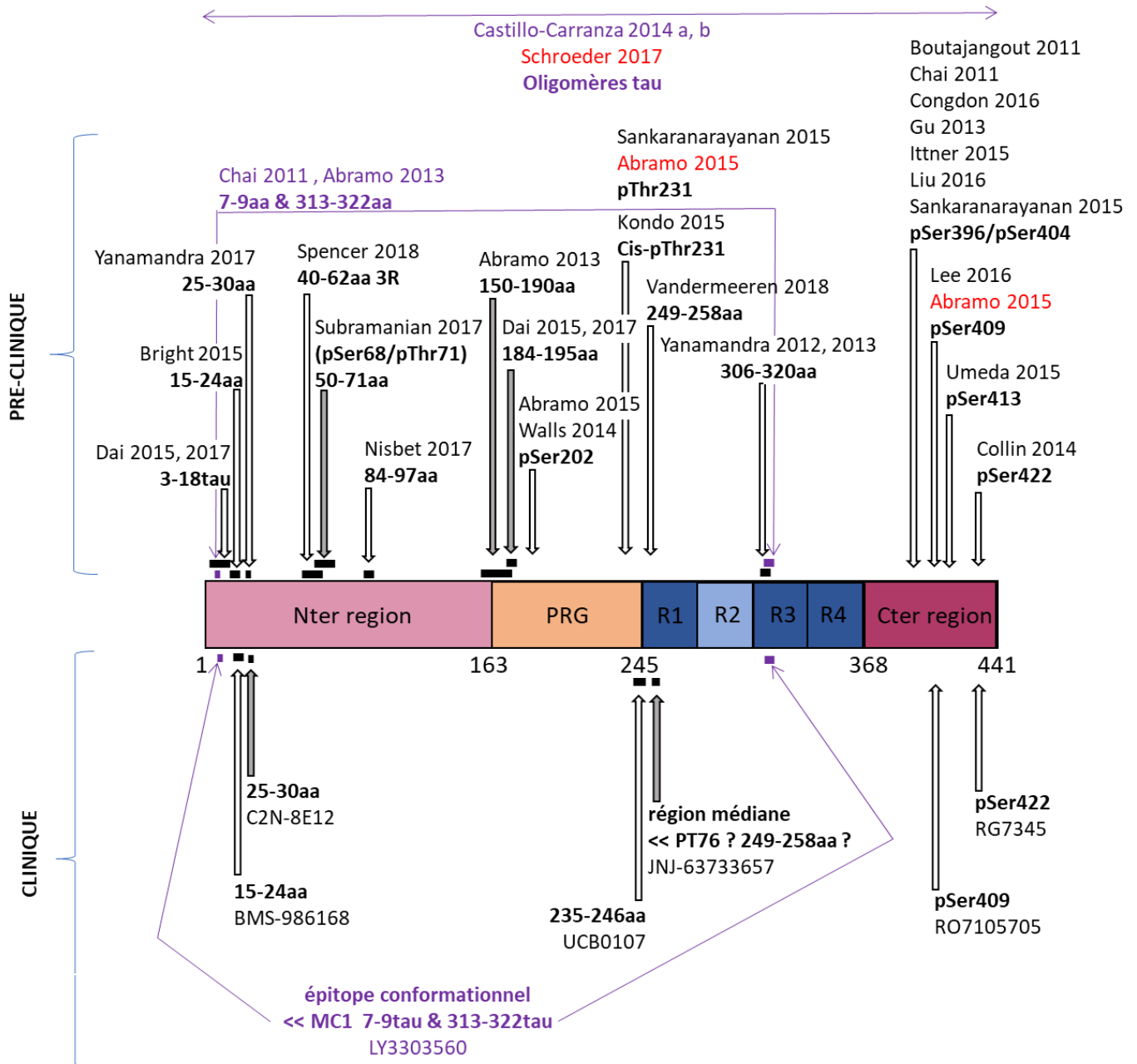
### **III. Immunothérapie passive**

Contrairement à l'immunothérapie active, l'immunothérapie passive n'implique pas la stimulation du système immunitaire du patient et n'est, par conséquent, pas impactée par l'âge des sujets à traiter. Elle consiste en des injections régulières d'anticorps monoclonaux. Un des avantages de ce traitement est le fait de cibler un épitope en particulier, ce qui implique une spécificité potentielle plus importante envers la protéine d'intérêt. (Lemere and Masliah 2010; Cynis et al. 2016). De plus, au moindre signe de toxicité, l'immunothérapie passive peut être arrêtée très facilement. Les essais cliniques basés sur ce type d'immunothérapie pourront, de ce fait, aider à la sélection des épitopes pathologiques les plus prometteurs en vue de bloquer l'évolution des tauopathies.

Ces traitements passifs sont toutefois plus invasifs et potentiellement moins rentables en raison de la nécessité d'une production massive et coûteuse d'anticorps monoclonaux humanisés. Bien que les risques soient minimes, l'injection répétée d'anticorps pourrait, au fil du temps, résulter en la formation d'anti-anticorps, susceptibles d'avoir un effet neutralisant ou d'entraîner des effets secondaires telles la glomérulonéphrite et la vasculite.



De la même manière que pour l'immunothérapie active, avant de décrire plus en détails les études d'immunothérapie passive dirigées contre la protéine tau, la figure 17 présente les différents épitopes (et articles associés) testés à ce jour dans des études précliniques, en regard des épitopes actuellement testés en essais cliniques chez l'homme.



**Figure 17 : Bilan des études précliniques et cliniques réalisées à ce jour en immunothérapie passive.** Les épitopes de la protéine tau, ayant été ciblés par des traitements immunothérapeutiques passifs dans des études précliniques, sont présentés en regard des immunothérapies passives actuellement en essais cliniques chez l'homme. Au-dessus de chaque épitope, se trouve la référence du papier dans lequel les résultats des traitements immunothérapeutiques réalisés au départ d'anticorps ciblant cet épitope, ont été publiés. Les références écrites en rouge sont des travaux dont les traitements immunothérapeutiques n'ont pas été associés à des effets bénéfiques significatifs. Les anticorps écrits de couleur mauve présentent un épitope conformationnel.

### *III.1 Études précliniques*

Les traitements d'immunothérapie passive dirigés contre la protéine tau, ont montré une réduction significative de la tauopathie et/ou de la progression des déficits cognitifs. Ces résultats les placent indiscutablement au centre des traitements potentiels de la maladie d'Alzheimer.

#### III.1.1 Les différents épitopes

Tout comme pour la vaccination active, Boutajangout et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer l'efficacité d'une immunisation passive en vue de contrer la progression des tauopathies. En effet, l'administration de l'anticorps PHF1 ciblant les résidus phosphorylés pSer396 et pSer404 de la protéine tau, dans un modèle transgénique murin (JNPL3), permet de réduire significativement les formes insolubles et pathologiques de la protéine tau (Allal Boutajangout et al. 2011). Plusieurs groupes ont, par la suite, réalisé des études parallèles en ciblant un ou deux sites de phosphorylation et ont également observé un effet inhibiteur et bénéfique des traitements immunothérapeutiques sur le développement des tauopathies (Chai et al. 2011; Congdon et al. 2016; Gu, Congdon, and Sigurdsson 2013; A. Ittner et al. 2015; W. Liu et al. 2016; Sankaranarayanan et al. 2015).

L'efficacité potentielle de l'immunothérapie passive en vue d'empêcher la propagation des tauopathies a également été confirmée par de nombreuses études ciblant d'autres épitopes au sein des différentes régions de la protéine tau.

Dans certains cas, les anticorps utilisés pour les traitements immunothérapeutiques reconnaissent un site de phosphorylation particulier. Jusqu'à présent, à notre connaissance, ces traitements immunothérapeutiques dirigés contre des épitopes phosphorylés ont ciblé le résidu phospho-sérine 202 (pSer202) (d'Abramo et al. 2015; Walls et al. 2014), la phospho-thréonine 231 (pThr231) (Sankaranarayanan et al. 2015), la phospho-sérine 409 (pSer409) (S.-H. Lee et al. 2016), la phospho-sérine 413 (pSer413) (Umeda et al. 2015), ou encore la phospho-sérine 422 (pSer422) (Collin et al. 2014).

Le domaine de projection N-terminal de la protéine tau fut également la cible de nombreux traitements immunothérapeutiques. Jusqu'à présent, les anticorps testés ont ciblé l'épitope 50-71tau comportant les résidus pSer68 et pThr71 phosphorylés (Subramanian, Savanur, and Madhavadas 2017), les épitopes 6-18tau et 184-195tau (K Iqbal and Dai 2015; C. ling Dai et al. 2017; C. L. Dai et al. 2018), l'épitope 25-30tau (Yanamandra et al. 2013b; Ising et al. 2017a; Yanamandra et al. 2015). L'épitope 15-24tau (Bright et al. 2015), l'épitope 84-97tau (Nisbet, Van der Jeugd, et al. 2017). Et enfin, l'épitope 40-62tau3R, spécifique de l'isoforme 3R de la protéine (Spencer et al. 2018)

Un anticorps ciblant l'ensemble des protéines tau dont l'épitope (150-190tau) se trouve à la jonction entre les domaines N-terminal et le domaine riche en prolines a également été testé (d'Abramo et al. 2013).

Tout récemment, les entreprises pharmaceutiques Janssen et UCB BioPharma ont mis en évidence le haut potentiel de traitements immunothérapeutiques ciblant la protéine tau en sa région centrale : (249-258tau) (Vandermeeren et al. 2018) et (235-250tau) (Courade et al. 2018).

A notre connaissance, un seul épitope (306–320tau) au sein des régions domaines de répétition du domaine de liaison aux microtubules, a été la cible d'immunothérapies passives (Yanamandra et al. 2013b; Kfoury et al. 2012).

Certaines immunothérapies passives ont ciblé une conformation pathologique de la protéine tau. Dans les études de Chai ou d'Abramo, les effets bénéfiques de l'administration de l'anticorps MC1, connu pour reconnaître un repliement pathologique de la protéine tau (épitopes 7-9tau et 313-322tau) ont été testés (Chai et al. 2011; d'Abramo et al. 2013).

Une autre conformation pathologique a été ciblée par Kondo et ses collaborateurs. Il a été mis en évidence qu'en cas de lésions cérébrales traumatiques (TBI), les protéines tau phosphorylées, adoptent principalement une conformation cis qui ne peut plus promouvoir l'assemblage des microtubules, qui est plus résistante à la déphosphorylation et à la dégradation, plus favorable à la formation d'agrégats et au développement de tauopathies. Leur équipe a créé un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme cis au niveau de l'épitope phosphorylé pThr231 qui est en mesure de prévenir les désagréments associés à cette formation et empêcher le développement de tauopathies (Kondo et al. 2015).

Les oligomères tau étant de plus en plus considérés comme les réelles espèces toxiques et potentiellement propagatrices, les effets protecteurs d'une immunothérapie passive au départ d'un anticorps ciblant spécifiquement les oligomères (TOMA), ont également été confirmés par Castillo-Carranza et ses collaborateurs (Diana L. Castillo-Carranza et al. 2014; D. L. Castillo-Carranza et al. 2014).

Certains des épitopes cités ci-dessus ayant montrés des effets prometteurs, se sont révélés inefficaces lorsqu'ils ont été la cible d'autres anticorps. C'est le cas dans les travaux d'Abramo et collaborateurs où des traitements immunothérapeutiques au départ d'anticorps dirigés contre les résidus pThr231 ou pSer409, n'ont montré aucun effet bénéfique dans leur modèle *in vivo* (d'Abramo et al. 2015). Plus récemment, l'équipe de Schroeder et collaborateurs a réalisé un traitement immunothérapeutique au départ de l'anticorps TOMA ciblant les oligomères de tau mais l'injection intrapéritonéale répétée de l'anticorps n'eut aucun effet sur l'évolution de la tauopathie (Schroeder et al. 2017). Ces différences

d'efficacité peuvent être en lien avec un modèle *in vivo* de tauopathie plus agressive et de ce fait plus difficile à contrer, un mode d'administration différent de l'anticorps, une affinité de liaison à l'antigène plus ou moins importante, une variation légère dans l'épitope reconnu et associée à une reconnaissance d'espèces différentes de tau ou encore un anticorps d'isotype distinct, associé à un mécanisme d'action différent. Ceci démontre à quel point il est difficile, au départ de ces études aux traitements immunothérapeutiques hétérogènes, de définir les épitopes les plus prometteurs au sein de la protéine.

### III.1.2 Les voies d'administrations

Si l'on s'intéresse au mode d'administration des traitements immunothérapeutiques, on se rend compte que la majorité des études se basent sur des injections intrapéritonéales d'anticorps. Ceci est probablement à mettre en lien avec le caractère peu invasif de ce mode d'administration. Cependant, des voies d'administration telle l'injection intraveineuse ont été également testées dans les études de Dai et Castillo-Carranza (C. ling Dai et al. 2017; D. L. Castillo-Carranza et al. 2014). Walls et collaborateurs ont étudié l'effet d'une injection intra-crâniale d'anticorps dirigés contre la protéine tau directement dans l'hippocampe (Walls et al. 2014). D'autres travaux se basent sur une délivrance intracérébro-ventriculaire continue à l'aide de pompes (Yanamandra et al. 2013a) ou délivrance directe, en un temps, à l'aide d'une seringue (Diana L. Castillo-Carranza et al. 2014; Ising et al. 2017a). Kondo et collaborateurs ont quant à eux, décidé d'associer à la fois des injections d'anticorps intrapéritonéales et une injection intra-cérébro-ventriculaire (Kondo et al. 2015). Enfin, à notre connaissance, Nisbet et collaborateur, sont les seuls à avoir administré leur anticorps par voie rétro-orbitale (Nisbet, Van Der Jeugd, et al. 2017). Dans certaines études, en vue d'éviter les administrations répétées, les chercheurs ont décidé d'utiliser des vecteurs viraux codant pour l'anticorps cible. Jusqu'à ce jour, les voies d'administration de ces vecteurs viraux consistent en une injection intracérébrale (W. Liu et al. 2016) ou intra-cérébro-ventriculaire (Ising et al. 2017b) de vecteurs associés aux adénovirus (AAV) ou encore, une injection intrapéritonéale de vecteurs lentiviraux (Spencer et al. 2018).

### III.1.3 Mécanisme d'actions

Dans certaines études, les auteurs ont essayé de définir les mécanismes d'actions sous-jacents aux effets bénéfiques des traitements immunothérapeutiques. Selon l'anticorps utilisé, les mécanismes de clairance intra et/ou extracellulaire sont observés.

En présence de traitements immunothérapeutiques, le premier mode de clairance qui vient à l'esprit est une internalisation puis dégradation des complexes « anticorps-antigène » par la microglie via une internalisation médiée par les récepteurs Fc. Pourtant, dans ce chapitre, il sera montré que ce mode de clairance n'est pas systématique.

#### *Clairance intracellulaire :*

Boutajangout et ses collaborateurs suggèrent une action intraneuronale via la voie de dégradation lysosomale en mettant en évidence une colocalisation de l'anticorps PHF1 avec les agrégats intracellulaires de protéines tau ainsi que les marqueurs endosomal et lysosomal. Le niveau de microglyose et d'astroglyose n'est pas affecté par le traitement immunothérapeutique (Allal Boutajangout et al. 2011). Dans l'étude de Collin et collaborateurs, l'anticorps reconnaissant le site de phosphorylation pathologique pSer422 est également visualisé au sein des neurones contenant des agrégats de protéines tau. L'anticorps se lierait à la protéine tau phosphorylée contenue dans les radeaux lipidiques ce qui induirait une endocytose et aboutirait à une clairance lysosomale. Une partie des anticorps pourraient échapper à la dégradation lysosomale et agir dans le cytoplasme en prévenant la fibrillation intracellulaire.

Dans les études de Yanamandra et collaborateurs, l'anticorps se lierait aux protéines tau extracellulaires, ce qui empêcherait leur internalisation neuronale. L'accumulation des complexes « anticorps-antigène » dans le milieu extracellulaire aboutirait à une clairance microgliale, en regard de l'augmentation de l'internalisation des agrégats de protéines tau dans la lignée microgliale BV2 en présence de l'anticorps thérapeutique. Pourtant, dans leur modèle *in vivo*, une diminution de l'activité microgliale est observée chez les souris traitées au départ de l'anticorps. Cette diminution en regard des souris contrôles s'expliquerait par la diminution de la tauopathie et des neurodégénérescences observées en présence du traitement immunothérapeutique (Yanamandra et al. 2013b, 2015).

Dans certains travaux, les auteurs désirent s'assurer de la localisation intracellulaire, voire intraneuronale de leurs anticorps, ont utilisé des outils comme les ultrasons (Nisbet, Van der Jeugd, et al. 2017), la fusion à un fragment de l'apolipoprotéine-B (Spencer et al. 2018) , ou l'injection intracérébrale de vecteurs associés aux adénovirus codant pour l'anticorps thérapeutique (Ising et al. 2017a; W. Liu et al. 2016).

### *Clairance extracellulaire :*

Sur base d'une absence de colocalisation avec les marqueurs endosomaux et lysosomiaux ainsi que l'absence d'effet des traitements immunothérapeutiques sur l'activité microgliale, l'anticorps TOMA, ciblant les formes oligomériques de tau, aurait une action exclusivement extracellulaire. Les auteurs posent l'hypothèse que TOMA serait à l'origine d'une déplétion des oligomères extracellulaires provoquant un déplacement de l'équilibre entre les protéines tau, contenues dans les milieux intra- et extracellulaire. Ce déséquilibre aurait pour conséquence une libération et une baisse des protéines tau intracellulaires. Un mécanisme d'action similaire a été observé pour des anticorps ciblant le peptide amyloïde  $\beta$  et la synucléine (Oddo et al. 2004; Masliah et al. 2005). Les anticorps MC1 et DA31, utilisés par Abramo et ses collaborateurs n'ont également pas été détectés au sein des neurones et n'affectent pas l'activité de la microglie, ce qui laisse présager un mode d'action similaire (d'Abramo et al. 2013).

Enfin, Bright et ses collaborateurs ont montré que l'anticorps IPN002 (version murine de B1B092) ne semblait pas cibler les formes pathologiques intracellulaires et agirait dans le milieu extracellulaire où il se lie abondamment aux protéines tau libres.

Le système «glymphatique», défini par un réseau de canaux para-vasculaires cérébraux, au contact du LCR, facilite l'élimination des solutés interstitiels et a été définis comme l'une des voies d'élimination du peptide amyloïde et de la protéine tau. De plus, une réduction et un dysfonctionnement de cette voie semblent favoriser l'apparition de tauopathies neurofibrillaires. En cas d'une localisation exclusivement extracellulaire, il est envisageable que le mécanismes d'action des anticorps consiste à favoriser la clairance des protéines tau pathologiques via cette voie glymphatique (Iliff et al. 2014).

Pour finir, Sigurdsson et ses collaborateurs sont très certainement les chercheurs qui se sont intéressés avec le plus d'assiduité à l'étude du mécanisme d'action de leur anticorps anti-tau. Ce qui est très intéressant au sein de leurs travaux est la mise en évidence d'un mécanisme d'action à la fois intra et extracellulaire. Ils ont montré que l'anticorps pouvait agir en bloquant l'internalisation et en maintenant les espèces pathologiques dans le milieu extracellulaire. Ensuite, ils ont également mis en évidence un mécanisme de clairance intracellulaire impliquant une internalisation essentiellement neuronale, clathrine-dépendante, médiée par les récepteurs Fc qui aboutit à une dégradation lysosomale ou quelques fois autophagique. Ils ont également montré que la dégradation par la microglie ne serait que très peu impliquée (Gu, Congdon, and Sigurdsson 2013; Congdon et al. 2016). Ceci démontre que la mise en évidence d'une localisation intracellulaire des anticorps thérapeutiques n'est pas suffisante pour conclure sur un mode d'action ou une clairance exclusivement intracellulaire. Il se peut qu'une voie de clairance extracellulaire soit également impliquée et dans ce cas, il paraît difficile de conclure sur l'ampleur de l'implication des deux modes de clairance complémentaires.

### III.1.4 Implication de la microglie

Dans certains cas, l'immunothérapie passive comme active s'est vue associée à une microglyose et/ou astrocytose amenant ainsi un risque de réactions inflammatoires délétères, probablement en lien avec une clairance microgliale ou astrocytaire des complexes « anticorps-antigène » (C. ling Dai et al. 2017; S.-H. Lee et al. 2016; Spencer et al. 2018; Boimel et al. 2010; Rosenmann et al. 2006; Rozenstein-Tsalkovich et al. 2013).

Bien que jusqu'à présent, ce problème semble peu fréquent en immunothérapie passive (Allal Boutajangout et al. 2011; Chai et al. 2011; D. L. Castillo-Carranza et al. 2014; Yanamandra et al. 2013b; d'Abramo et al. 2013), il semble plus prudent de minimiser les risques au maximum, au vu des conséquences désastreuses que peuvent avoir une réaction inflammatoire. En effet, un essai clinique dirigé contre le peptide amyloïde beta a été arrêté suite à une toxicité vasculaire en lien avec une activation des récepteurs Fc $\gamma$  présents sur la microglie (Orgogozo et al. 2003; Adolfsson et al. 2012; Freeman et al. 2012; Senior 2002; Nicoll et al. 2003).

En réponse à cela, certaines équipes de recherche ont décidé d'évaluer l'implication et la nécessité des groupements Fc dans le mécanisme d'action d'anticorps thérapeutiques.

En 2016, Lee et collaborateurs ont testé l'efficacité de deux anticorps identiques dirigés contre la protéine tau, à l'exception de la possession ou non d'un domaine Fc fonctionnel. Les deux anticorps réduisent significativement les formes pathologiques de la protéine tau ce qui indique qu'un domaine Fc fonctionnel n'est pas forcément requis pour observer une efficacité du traitement immunothérapeutique. Ensuite, il fut montré que le dépôt de protéines tau pathologiques sur des co-cultures neurones-microglie, aboutit à une toxicité neuronale que seul l'anticorps ne présentant pas de domaine Fc fonctionnel peut entièrement prévenir. Ceci s'explique par une internalisation des complexes « anticorps-antigène » via le récepteur Fc fonctionnel dans la microglie qui aboutit à la libération de cytokines pro-inflammatoires toxiques pour les cellules neuronales. Ces résultats démontrent qu'un récepteur Fc fonctionnel n'est pas forcément requis pour observer un effet bénéfique des traitements immunothérapeutiques et en cas de clairance microgliale, la présence de ce dernier pourrait même être associée à une réaction inflammatoire délétère.

D'autres équipes ont montré que la suppression du domaine Fc, en parallèle d'une redirection vers une clairance neuronale des complexes « anticorps-antigène », permet de profiter des effets bénéfiques du traitement immunothérapeutiques sans craindre de réactions inflammatoires. Les fragments variables à une seule chaîne (scFv) sont des immunoglobulines G qui ne possèdent pas de domaine Fc et résultent de la fusion des domaines variables. Leur poids moléculaire plus faible (30kDa versus 150kDa pour une IgG) facilite la pénétration des tissus, le transfert au travers de la barrière

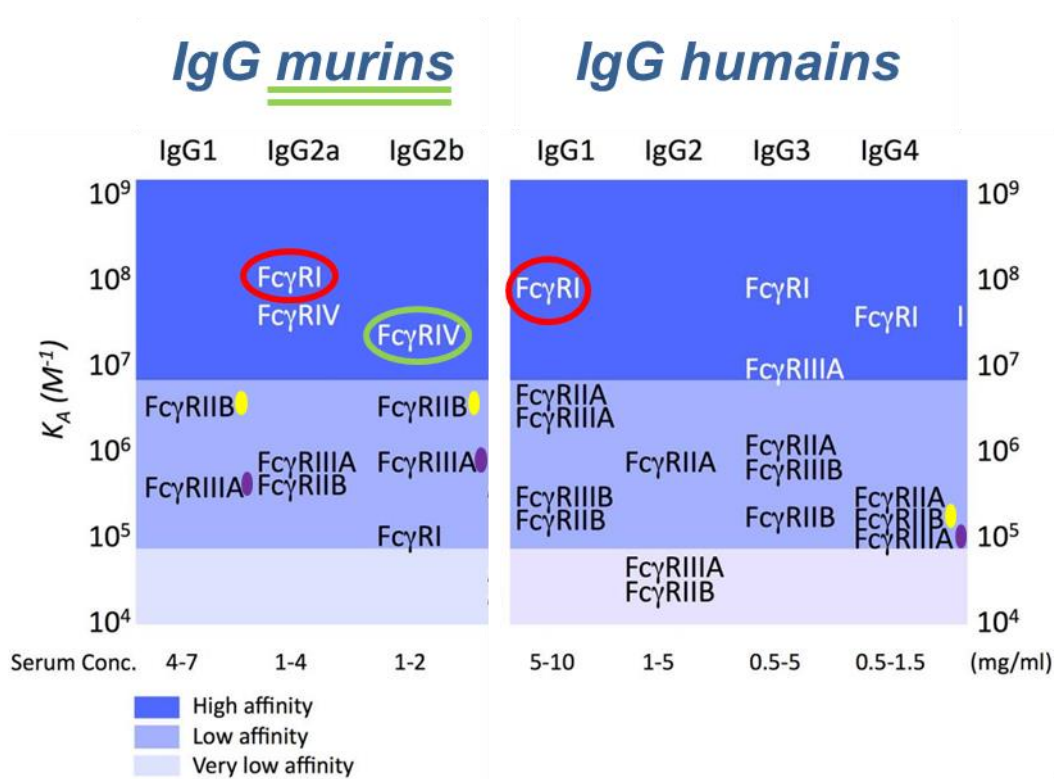
hémato-encéphalique et l'internalisation au sein des cellules du cerveau mais est associé à des propriétés pharmacocinétiques moins intéressantes (Wilcock et al. 2006; Krishnaswamy et al. 2014). Bien que ces études suggèrent que l'utilisation des anticorps au format scFv implique une meilleure absorption neuronale, Nisbet et collaborateurs ont décidé d'appliquer des ultrasons de manière à faciliter l'acheminement de leurs anticorps au cerveau. Le mécanisme d'internalisation par ultrason de ces anticorps dépourvus de groupement Fc se ferait par bulck endocytose (Afadzi et al. 2013). Une fois à l'intérieur des neurones, les scFvs ne se retrouvent pas dans les endosomes et évitent donc la voie de dégradation lysosomale, ce qui suggère une action intracellulaire par liaison aux protéines tau cytoplasmiques. Cette liaison pourrait, entre autre, empêcher l'interaction de la protéine tau avec certaines kinases responsables de l'hyperphosphorylation. Spencer et collaborateurs ont également testé un anticorps scFv auquel ils ont greffé un fragment de l'apolipoprotéine B (ApoB) en vue de permettre un meilleur acheminement de l'anticorps au cerveau mais également une capture des complexes anticorps-antigènes exclusivement neuronale. L'ajout de ce fragment ApoB résulte en l'efficacité du traitement immunothérapeutique et la clairance exclusivement neuronale qui y est associée et permet une baisse significative de l'astrocytose.

### III.1.5 Choix de l'Isotype

L'ensemble des traitements immunothérapeutiques décrits ont utilisé des immunoglobulines de type gamma (IgG). Au sein des IgG, on distingue plusieurs isotypes présentant des domaines Fc aux propriétés distinctes. En règle générale, chez l'homme, l'action des immunoglobulines G d'isotypes IgG1 et IgG3 nécessite les fonctions effectrices du groupement Fc, tandis que l'action des isotypes IgG2 et IgG4 semble indépendante de ces fonctions Fc. En vue d'une utilisation clinique thérapeutique, seules les immunoglobulines G de type 1 et 4 sont employées.

Sur base de ces informations, selon l'isotype de l'anticorps utilisé, nous devrions être en mesure de spéculer un mode d'action intra ou extracellulaire. Cependant, l'ensemble des études précliniques présentées ont été réalisées sur des modèles murins de tauopathies. Ceci implique l'obligation d'utilisation d'anticorps murins ou murinisés pour éviter tout risque de réactions auto-immunes chez les animaux traités. Les isotypes retrouvés chez l'homme et la souris sont différents et pour une même appellation ne sont pas forcément associés à des fonctions effectrices équivalentes. Etant donné que l'objectif initial des études précliniques est de mettre en évidence des anticorps associés à un haut potentiel thérapeutique dont la forme humanisée pourra *in fine* être testée chez l'Homme, il est indispensable de faire un point comparatif entre les propriétés isotypiques des immunoglobulines G murines et humaines (Jönsson and Daëron 2012). (Figure 18)





**Figure 18 : Affinité des immunoglobulines G murines et humaines en regard des différents Fc récepteurs. Modifié de (Jönsson and Daëron 2012).**

Il existe 2 types de Fc récepteurs : les récepteurs Fc de haute (FcγRI et FcγRIV) et de faible affinité (FcγRII and III). Les récepteurs de haute affinité lient les immunoglobulines G sous leur forme monomérique, tandis que les récepteurs Fc de faible affinité ne sont en mesure de lier l'anticorps que lorsque ce dernier forme un complexe avec son antigène cible. L'activation de la voie des récepteurs Fc nécessite le regroupement membranaire de plusieurs récepteurs Fc fixés à des complexes « anticorps-antigène ». L'activation des récepteurs Fc de haute affinité se déclenche potentiellement lors de fixation d'antigènes extracellulaires aux IgG préalablement fixés aux récepteurs. Tandis que l'activation des récepteurs Fc de faible affinité demandera une fixation préalable des antigènes aux anticorps dans le milieu extracellulaire avant liaison, puis regroupement et activation potentiels de la voie de signalisation des récepteurs Fc.

Lors de leur activation, la plupart des récepteurs Fc vont émettre un signal activateur permettant de déclencher la voie de signalisation des récepteurs Fc. Seul l'activation du récepteur FcγRIIB est associée à l'émission de signaux inhibiteurs. Chaque cellule présentera à la fois des récepteurs Fc activateurs et inhibiteurs et l'activation de la voie de signalisation des récepteurs Fc sera observée en cas de dominance des signaux activateurs au regard des signaux inhibiteurs.

Les traitements immunothérapeutiques chez l'Homme utilisent des immunoglobulines G humaines de type IgG1 et IgG4, il est donc intéressant d'étudier quels isotypes murins ont le plus de similitudes avec ces deux isotypes humains. En effet, au plus les propriétés des anticorps murins testés dans les études précliniques sont proches de celles des anticorps thérapeutiques humanisés, au plus ce modèle sera pertinent en vue de prédire un effet potentiel chez l'Homme.

Concernant l'isotype IgG1 humain, de par sa forte affinité pour le récepteur FcγRI, l'isotype murin le plus proche est l'IgG2a. Concernant l'IgG4, l'analyse est un peu plus complexe. Bien que moins affin que l'IgG1, l'IgG4 humain présente tout de même une haute affinité pour le récepteur FcγRI. De par une affinité de même ordre pour le récepteur FcγRIV (récepteur de haute affinité tel le FcγRI), l'IgG2b de souris semble, à première vue, l'isotype murin le plus proche de l'IgG4 humain. Seulement, le récepteur FcγRIV est un récepteur Fc exclusivement murin et de ce fait, absent chez l'Homme. Tester un anticorps à visée thérapeutique humaine au départ d'un homologue murin dont la plus haute affinité est dirigée envers un récepteur non présent chez l'Homme ne semble pas idéal. De ce fait, il semblerait que l'IgG1 murin soit l'anticorps le plus pertinent à utiliser en vue de tester les effets potentiels d'un anticorps thérapeutique IgG4 humanisé. Cette comparaison entre les propriétés des anticorps humains et murins rappelle les limites des modèles animaux en vue de prédire des effets thérapeutiques potentiels chez l'Homme.

En théorie, il est donc possible de prédire le mode d'action et de clairance des anticorps murins selon leur isotype et leurs affinités respectives pour les différents récepteurs Fc. De son affinité préférentielle pour les récepteurs inhibiteurs FcγRIIB, les anticorps murins d'isotype IgG1, ne devraient pas être associés à une internalisation et clairance microgliale. Contrairement aux anticorps IgG2a qui, de par leur forte reconnaissance des récepteurs Fc de haute affinité (FcγRI et IV), auront probablement un mode de clairance impliquant la microglie. Enfin, de par leur forte affinité pour les FcγRIV, les IgG2b pourraient également être internalisés par les cellules gliales mais peut-être de manière moins importante que les IgG2a, de par une affinité parallèle plus conséquente pour les récepteurs FcγRIIB inhibiteurs.

Isotype	Article	Anticorps	Internalisation	
			Neurones	Microglie
IgG1	<i>Boutajangout 2011</i>	PHF1	Oui	?
	<i>Collin 2014</i>	MAB86	Oui ( <i>Fc-R non-dépendant</i> )	?
	<i>Abramo 2013</i>	MC1	Non	?
	<i>Bright 2015</i>	IPN002	Non	?
	<i>Congdon 2013, 2016</i>	4E6	Oui ( <i>endocytose Fc-RII&amp;III dépendante si cible en intracellulaire</i> )	Non
IgG2a	<i>Lee 2016</i>	anti-p409	Non	Oui ( <i>Fc-R dépendant</i> )
	<i>Castillo-Carranza 2014 a, b</i>	TOMA	Non	?
IgG2b	<i>Yanamandra 2014, 2015</i>	HJ 8.5	Non	Oui ( <i>BV2</i> )

**Figure 19 : Table reprenant les informations disponibles concernant l'internalisation neuronale et microgliale d'immunoglobulines G murines en regard de l'isotype.**

Sur l'ensemble des études précliniques, seules quelques-unes ont réellement étudié l'implication d'une potentielle clairance microgliale en présence des anticorps thérapeutiques. Ces études, bien que peu nombreuses, semblent confirmer une absence de clairance via la microglie en présence de l'isotype IgG1 (Congdon 2013-2016) et montrent une internalisation microgliale pour les isotypes IgG2a (S.-H. Lee et al. 2016) et IgG2b (Yanamandra et al. 2013a, 2015). (Figure 19) De manière plus surprenante, quelques équipes de recherche ont mis en évidence l'internalisation neuronale d'anticorps d'isotype IgG1. Les trois études relatant cette localisation intraneuronale des anticorps IgG1 semblent s'accorder sur l'importance d'une présence intracellulaire de l'antigène pour observer une internalisation. Boutajangout montre une colocalisation de PHF1 avec les agrégats intracellulaires (Allal Boutajangout et al. 2011). Collin décrit une internalisation médiée par la liaison de l'anticorps à la protéine tau hyperphosphorylée retrouvée au sein des radeaux lipidiques (Collin et al. 2014). Enfin, Congdon montre une internalisation cellulaire de son anticorps IgG1 au contact de cellules préalablement incubée en présence de PHFs. Dans ce même modèle, aucune internalisation de ce type n'est observée quand l'anticorps est incubé seul (ou complexé à des PHFs) au contact de cellules saines dépourvues d'antigène (Congdon et al. 2016).

Concernant l'implication des récepteurs Fc dans ces internalisations neuronales d'anticorps IgG1, Collin et ses collaborateurs décrivent une voie d'internalisation qui n'a pas recours à aux récepteurs Fc. De leur côté, Congdon et ses collaborateurs ont mis en évidence une implication des récepteurs FcγRII/III qui permettent l'internalisation des anticorps via une endocytose clathrine-dépendante. Le fait que cette internalisation ne soit observée que moyennant une pré-incubation des cellules en

présence de PHFs, laisse entendre que l'internalisation de protéines tau pathologiques pourrait induire une augmentation de la quantité de récepteurs FcγRII/III présentés à la membrane. Bien que cette hypothèse n'ait, à notre connaissance pas encore été étudiée, il a été montré que la présence d'immunoglobulines G dans le milieu extracellulaire était suffisante pour augmenter la quantité des récepteurs Fc neuronaux (Gu, Congdon, and Sigurdsson 2013). Ces résultats de Congdon sont très prometteurs car ils démontrent que leur anticorps d'isotype IgG1 est à la fois en mesure de s'opposer à l'internalisation des formes pathologiques extracellulaires mais également de cibler les protéines tau pathologiques intercellulaires dans les cellules déjà touchées par la tauopathie.

En résumé, on peut s'attendre à une clairance microgliale en présence d'anticorps murins d'isotypes IgG2a et IgG2b. A l'opposé, une clairance microgliale semble peu probable dans le cas d'anticorps murins d'isotype IgG1. Concernant cet isotype de type 1, une clairance exclusivement extracellulaire est attendue bien qu'il ait été montré que dans certains cas, des anticorps d'isotype IgG1 ont également été associés à des actions intracellulaires.

### III.1.6 Effet potentiellement bénéfique sur la pathologie amyloïde

Comme cela avait été mis en évidence en vaccination active par Rajamohamedsait et collaborateurs, ces études précliniques d'immunothérapie passive ont également démontré les répercussions positives que peuvent avoir un traitement dirigé contre la protéine tau, sur la pathologie amyloïde (Rajamohamedsait et al. 2017). En 2015, Bright et ses collaborateurs ont mis en évidence que des formes de tau (fragments N-terminaux sécrétés de tau) étaient en mesure d'augmenter significativement le niveau des peptides amyloïdes Aβ40 et 42. Ensuite, ils ont montré, qu'un traitement immunothérapeutique avec l'anticorps IPN002 (version murine de BIIB092) ciblant l'extrémité N-terminale de la protéine tau (15-24tau) était associé à une baisse significative des niveaux d'Aβ40 et 42. Sur base de ces résultats, ils ont posé l'hypothèse que la pathologie amyloïde était peut-être l'élément déclencheur de la tauopathie, mais qu'une fois la tauopathie installée, les formes sécrétées et pathologiques de tau semblaient également en mesure d'accentuer la pathologie Aβ. Nous serions face à un cycle destructeur où les deux pathologies concomitantes s'auto-stimulent. Deux ans plus tard, les travaux de Dai et collaborateurs, réalisés sur les souris 3xTg-AD, ont montré qu'un traitement immunothérapeutique utilisant l'anticorps anti-tau N-terminal 43D permettait de réduire significativement la tauopathie mais également les plaques amyloïdes (C. ling Dai et al. 2017). Plus récemment, leurs travaux ont montré que l'injection intracérébrale d'extraits de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, induisait une augmentation significative de la pathologie amyloïde et ont mis en évidence que cette augmentation semblait limitée en présence d'injections répétées de ce même anticorps (C. L. Dai et al. 2018). Bien que cet effet bénéfique potentiel des

traitements anti-tau sur la pathologie amyloïde soit prometteur en vue des essais cliniques d'immunothérapie passive ciblant la protéine tau, il faut garder à l'esprit que d'autres études ont démontré dans certains cas, que réduire la tauopathie n'affectait pas forcément de manière significative la pathologie amyloïde (Walls et al. 2014).

### III.2 Études cliniques

En immunothérapie passive, un des premiers anticorps anti-tau testés en essai clinique, est le **RG7345** (RO6926496, MAb86, F. Hoffmann-La Roche Ltd.). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé ciblant un épitope phosphorylé pathologique : la phospho-Sérine422. Bien que cibler cet épitope pathologique dans les études précliniques fut associé à une réduction significative de la tauopathie chez des souris transgéniques 224, le RG7345 fut interrompu, suite aux résultats cliniques de la phase 1, probablement en raison d'un profil pharmacocinétique non-favorable (Collin et al. 2014; Panza et al. 2016).

**BIIB092** (BMS-986168, IPN007, Bristol-Myers Squibb Company, Biogen), un anticorps IgG4 monoclonal humanisé, fut le second anticorps anti-tau testé en essais cliniques. Il reconnaît des fragments N-terminaux extracellulaires (eTau), sécrétés par des neurones issus de cellules souches dérivées de patients atteints de formes héréditaires de la maladie d'Alzheimer. Dans les études précliniques, cet anticorps a été en mesure de diminuer significativement à la fois la tauopathie et la pathologie amyloïde (Bright et al. 2015; West et al. 2017). Tout en contrôlant l'innocuité et la tolérance de BIIB092 chez des sujets sains un essai clinique de phase I a évalué les effets d'injections intraveineuses de l'anticorps chez 48 patients atteints de PSP (étude CN002-003, identifiant ClinicalTrials.gov: NCT02460094). Cet essai consistait en une administration unique de doses croissantes d'anticorps au sein de différents groupes de patients afin d'évaluer l'innocuité et les effets potentiels sur le niveau de protéines tau dans le LCR. Une prolongation de cette étude a été proposée aux patients afin d'évaluer la toxicité à long terme en réponse à de multiples perfusions (étude CN002-004, identifiant ClinicalTrials.gov: NCT02658916) (Panza et al. 2016). Enfin, un essai de phase II impliquant 400 patients atteints de PSP et l'administration de doses croissantes d'anticorps est actuellement en cours.

L'anticorps recombinant humanisé **Abbv-8E12** (C2N-8E12, C2N Diagnostics, LLC, MO, USA et AbbVie, IL) reconnaît les acides aminés 25 à 30 de la protéine tau. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré la capacité de cet anticorps à induire une baisse significative des protéines tau agrégées et hyperphosphorylées ainsi qu'à prévenir les déficits cognitifs (Yanamandra et al. 2013b; Panza et al. 2016; Yanamandra et al. 2015). L'essai clinique de phase I, consistant en l'administration de Abbv-8E12 à des patients atteints de PSP, n'a rapporté aucun effet indésirable majeur. (Identifiant ClinicalTrials.gov: NCT02494024) (West et al. 2017). Deux essais de phase II ont ensuite été initiés, l'un

sur 330 patients atteints de PSP 253 et l'autre chez 400 patients souffrant de stades précoces de la maladie d'Alzheimer. Ces études continueront jusqu'en 2019 et 2020.

Concernant le **RO 7105705**, bien que son épitope n'ait pas été divulgué, cet anticorps anti-tau ciblerait la pSer409 (S.-H. Lee et al. 2016). Actuellement l'innocuité de cet anticorps est testée dans un essai clinique de phase I chez des individus sains ainsi que chez des patients présentant des maladies d'Alzheimer de stade léger à modéré. Les participants se voient administrés une dose unique ou des doses multiples de RO 7105705 pour évaluer sa tolérance et définir ses propriétés pharmacocinétiques. Bien que le nombre de patients impliqués dans cette étude soit insuffisant pour conclure sur l'efficacité du RO 7105705, la démence clinique des patients traités et atteints de maladie d'Alzheimer, sera tout de même évaluée. Selon les derniers communiqués, l'anticorps semble bien toléré par les patients et est détectable dans le LCR.

Comme pour l'anticorps précédent, l'épitope de **LY3303560** n'est pas clairement défini. Il s'agirait d'un épitope conformationnel. Eli Lilly a initié deux essais de phase I pour étudier l'innocuité et la pharmacocinétique de cet anticorps anti-tau. Le premier est réalisé chez des individus sains et des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et le second, chez des patients atteints de déficiences cognitives légères ou de la maladie d'Alzheimer. Dans le premier essai clinique, les sujets recevront une unique dose de LY3303560 qui pourra être comparée aux multiples doses que recevront les patients de la deuxième étude. Au cours de ces essais cliniques, les concentrations d'anticorps dans le sérum et le LCR seront étudiées. Ces études devraient se terminer en 2017 et 2020.

Récemment, deux nouveaux anticorps anti-tau sont entrés en essais cliniques chez l'homme. Janssen Pharmaceuticals a débuté un essai clinique de phase I d'immunisation passive avec le **JNJ-63733657**. L'essai recrute des individus sains et des patients atteints de la maladie d'Alzheimer pour évaluer l'innocuité, la tolérance et le profil pharmacologique de l'anticorps. JNJ-63733657 semble se lier à la région médiane de la protéine tau et serait conçu pour empêcher l'agrégation et la propagation de la protéine tau.

**UCB0107**, un anticorps anti-tau développé par l'entreprise UCB Biopharma, est également en essai clinique de phase I en vue de tester sa tolérance auprès d'individus sains. Les tests précliniques ont montré que l'anticorps **UCB0107** se lie aux acides aminés 235–250 dans la région de la protéine tau riche en proline et est en mesure de prévenir la nucléation et la propagation de formes pathologiques de tau.

Plusieurs anticorps devraient entrer en phase d'essais cliniques dans un avenir proche. Lundbeck développe actuellement un vaste panel d'anticorps anti-tau, ciblant à la fois la protéine tau totale et la protéine tau hyperphosphorylée pathologique retrouvée au sein des PHFs. Un anticorps monoclonal

de souris humanisé, ciblant spécifiquement la protéine tau hyperphosphorylée pathologique, semble sur le point d'entrer en essai clinique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (communication de J. T. Pedersen dans (Congdon and Sigurdsson 2018)).

Malgré un manque cruel d'informations concernant l'efficacité des études cliniques en cours et/ou réalisées jusqu'à présent, le développement de l'immunothérapie anti-tau est à ce jour exponentiel au vu des effets bénéfiques associés à ces traitements au sein des nombreuses études précliniques. Une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'agrégation et à la propagation de la pathologie, ainsi que le développement de biomarqueurs permettant un diagnostic précoce, semblent aujourd'hui indispensables en vue de pouvoir un jour, proposer des traitements réellement efficaces aux patients. En raison de l'absence d'impact de l'âge du sujet à traiter, de sa spécificité et du moindre risque de toxicité, l'immunothérapie passive reste actuellement un traitement thérapeutique potentiel très en vogue, en vue de définir les épitopes les plus prometteurs à cibler sur la protéine tau et bloquer l'évolution intracérébrale des tauopathies.

# Objectifs

L'immunothérapie dirigée contre la protéine tau a pris beaucoup d'ampleur ces dernières années dans les essais cliniques visant à s'opposer à la progression des tauopathies, telle la maladie d'Alzheimer. Malgré le peu d'informations actuellement disponibles pour juger de l'efficacité des traitements immunothérapeutiques chez l'homme, le développement de l'immunothérapie ciblant la protéine tau est en continuelle expansion au vu des effets bénéfiques associés à ces traitements, au sein des études précliniques.

Face à un manque cruel d'indications au sujet des épitopes de la protéine tau les plus pertinents à cibler en vue de neutraliser les espèces pathologiques de tau, l'entreprise pharmaceutique UCB Biopharma, a réalisé une immunisation à large échelle dirigée contre la protéine tau, au départ d'espèces fibrillaires purifiées (PHF-AD), de monomères de protéine tau, de fibres recombinantes ou de peptides porteurs d'épitopes pathologiques (Courade et al. 2018). En regard de ces immunisations ciblant toutes les formes de la protéine tau, l'anticorps D, ciblant un épitope central sur la protéine (acides aminés 235 à 250), s'est distingué par sa capacité à prévenir entièrement l'agrégation de tau *in vitro*, induite par une fraction enrichie en PHFs-AD. Les propriétés de l'anticorps D ont été comparées à celles de plusieurs anticorps anti-tau décrits dans la littérature, de même isotype mais ciblant des régions différentes de la protéine. Parmi ceux-ci, l'anticorps A, ciblant les acides aminés 15 à 24, est l'anticorps dont l'affinité, bien que supérieure, s'approche le plus de celle de l'anticorps D, à la fois pour les monomères de protéine tau que pour les PHFs-AD. Cependant, contrairement à l'anticorps D, *in vitro*, l'anticorps A n'est pas parvenu à s'opposer à l'agrégation induite par les PHFs-AD, ce qui démontre l'importance capitale du choix de l'épitope en vue de développer un traitement immunothérapeutique optimal. Dernièrement, l'entreprise Janssen a produit et caractérisé des anticorps d'épitopes distincts dirigés contre la protéine tau et a, de manière similaire, démontré l'efficacité supérieure d'un anticorps ciblant la région centrale de la protéine tau (tau249-258) (Vandermeeren et al. 2018).

En raison de cet intérêt nouveau pour la région centrale de la protéine tau, jusqu'alors non ciblée en immunothérapie, nous avons, au travers d'une collaboration avec l'entreprise UCB Biopharma, décidé de confirmer les propriétés de l'anticorps D et de l'anticorps A *in vivo*.

Dans un premier temps, désirant cibler des espèces extracellulaires de tau, en travaillant au départ de matériel humain, nous avons développé un modèle transgénique murin de tauopathie, basé sur le recrutement/nucléation de protéines tau humaines mutées, suite à l'injection intracérébrale d'extraits



de cerveau Alzheimer. Nous avons ensuite étudié, la capacité de l'anticorps A et D, à neutraliser les amorces pathologiques contenues dans un homogénat de cerveau humain Alzheimer.

Dans un second temps, la propagation intercellulaire d'espèces pathologiques de tau, étant à l'origine de la progression intracérébrale des tauopathies, nous avons reproduit et utilisé un deuxième modèle *in vivo*, basé sur l'injection intracérébrale de fibrilles K18-P301L, en vue d'étudier avec certitude un phénomène de propagation (Peeraer et al. 2015). Cette seconde étude, réalisée au sein de l'entreprise UCB BioPharma, a permis de juger de la capacité de l'anticorps D à bloquer la propagation intracérébrale d'espèces pathologiques de tau.

Les résultats générés ont permis la rédaction d'un article scientifique intitulé « Prevention of tau seeding and propagation by immunotherapy with a central tau epitope antibody », actuellement en cours de révision pour publication dans le journal BRAIN. Une copie de l'article est à votre disposition à la fin de ce manuscrit.

# Matériel et méthodes

## Animaux –

Les expériences in vivo effectuées, ont été réalisées suite à l'approbation de comités d'éthiques (accord APAFIS # 2264-2015101320441671 de CEEA75, Lille, France et ASYN-IC-PARKINSON-MO de LA1220040 et LA2220363, Brain l'Alleud, Belgique), conformément aux directives européennes 2010/63/UE et à la législation belge (française). Les animaux ont été logés dans des cages ventilées standards à température contrôlée (20-22 °C) et maintenues selon un cycle jour/nuit de 12 h. La nourriture et l'eau ont été en libre accès tout au long de l'étude.

### Modèle de nucléation :

Les souris THY-tau30 (Tg30tau) expriment dans le cerveau antérieur et la moelle épinière, la protéine tau humaine 1N4R comportant deux mutations pathogènes (P301S et G272V) sous le contrôle du promoteur neurone-spécifique Thy-1.2 (Leroy et al. 2007; Schindowski et al. 2006). L'accumulation progressive des enchevêtrements neurofibrillaires dans ces souris, va, au cours du temps, aboutir au développement d'une atrophie cérébrale et hippocampique, une axonopathie centrale et périphérique, ainsi que des déficits moteurs progressifs associés à une atrophie musculaire (Leroy et al. 2007). Des souris non-transgéniques de type sauvage (C57BL6), issues de mêmes portées, ont été utilisées comme contrôle. En vue de manipuler les souris Tg30tau avant l'apparition de la tauopathie intrinsèque, les expériences ont été réalisées au départ de souris âgées de un mois.

### Modèle de propagation :

Le second modèle transgénique utilisé, les souris htauP301L, expriment également sous le promoteur neuronal Thy-1.2, la protéine tau 2N4R humaine, porteuse de la mutation P301L (Terwel et al. 2005). Au sein de ce modèle de tauopathie au caractère moins agressif, l'accumulation des enchevêtrements neurofibrillaires n'aboutit, au cours du temps, qu'à des problèmes moteurs mineurs. L'apparition de la tauopathie intrinsèque à ce modèle étant plus tardive, les injections intracérébrales ont été réalisées sur des souris âgées de 4 mois.

Contrairement aux souris THY-tau30, élevées au sein de l'animalerie High-Tech E.O.P.S. (Exempt d'organismes Pathogènes Spécifiques) de Lille, les souris htauP301L ont été fournies par la société reMYND (Leuven, Belgique).

## Les anticorps –

Les anticorps utilisés pour les analyses immunohistochimiques et biochimiques sont décrits dans la table ci-dessous. Les anticorps utilisés pour les traitements immunothérapeutiques (A Ab, D Ab et Isotype Ab) sont décrits dans la section résultats et pour plus d'informations, se référer à l'article (Courade et al. 2018).

Antibody	Reactivity	Species	Supplier	Reference	Dilution (blocking)
<b>Immunohistochemistry</b>					
AT8	Human tau pS202/pT205/pS208	Mouse	Thermofisher	MN1020	1/500
AT100	Human tau pT212/pS214	Mouse	Thermofisher	MN1060	1/1000
AT8 biotin	Human tau pS202/pT205/pS208	Mouse	Thermofisher	MN1020B	1/30 000
<b>Western blot</b>					
M19G	Human tau Nter domain	Rabbit	Home-made (Buée's lab)	n.a.	1/10 000 (5% milk)
PSer396	Human tau pS396	Rabbit	Invitrogen	44-752G	1/10 000 (5% BSA)
AT100	Human tau pT212/pS214	Mouse	Thermofisher	MN1060	1/500 (w/o blocking)
AT8	Human tau pS202/pT205/pS208	Mouse	Thermofisher	MN1020	1/400 (w/o blocking)
A Ab	Human tau Nter domain	Mouse	UCB pharma	n.a.	1/2500 (5% BSA)
D Ab	Human tau 235-246 aa	Mouse	UCB pharma	n.a.	1/2500 (5% BSA)
Isotype Ab	human TNF $\alpha$	Mouse	UCB pharma	n.a.	1/2500 (5% BSA)
tau-E10	Human tau exon 10	Rabbit	Home-made (Buée's lab)	n.a.	1/4000 (5% milk)
<b>Immunofluorescence</b>					
AT8 biotin	Human tau pS202/pT205/pS208	Mouse	Thermofisher	MN1020B	1/500
					n.a. = non available

## Immunisation passive –

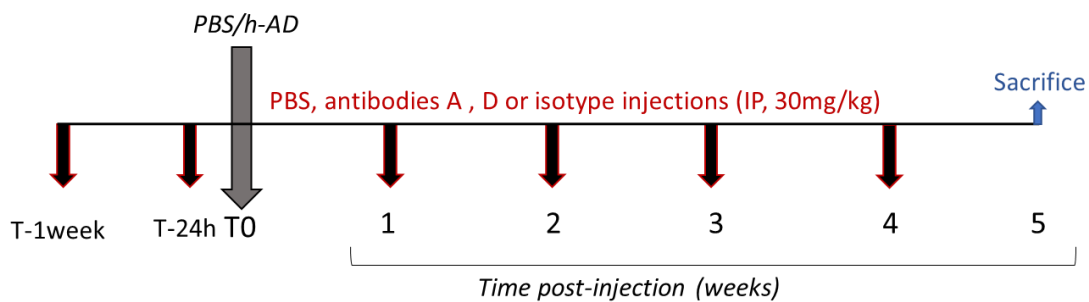
Les traitements immunothérapeutiques consistent en des injections intrapéritonéales (IP) répétées d'anticorps, à une concentration de 30 mg/kg, avant et après injection intracérébrale d'amorces pathologiques de tau.

Dans le modèle de nucléation, réalisé au départ de souris Tg30tau (UMR-S-1172, Lille, France), les anticorps ont été administrés par IP à une concentration de 30 mg/kg, 7 jours et 24 heures avant l'injection intracérébrale d'un homogénat de cerveau issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer, puis, de manière hebdomadaire pendant un durée de un mois. Cinq semaines après

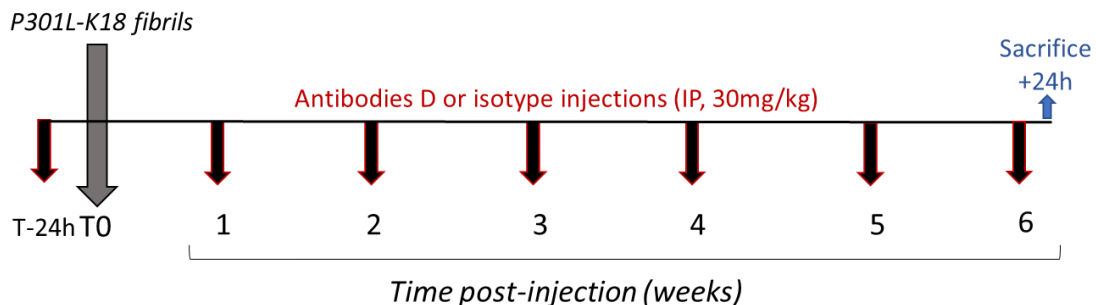
l'injection stéréotaxique, les souris ont été sacrifiées et les cerveaux prélevés pour quantifier les espèces pathologiques de tau par analyses immunohistochimique et biochimique. (Fig. 1.A)

Dans le modèle de propagation impliquant les souris hTauP301L (UCB Pharma, Braine l'Alleud, Belgique), les anticorps ont été administrés, 24 heures avant l'injection intracérébrale des fibrilles P301L-K18, puis de manière hebdomadaire pendant six semaines, avant de procéder au sacrifice, 24h après la dernière injection IP d'anticorps. (Fig. 1.B)

**A**



**B**



**Figure 1 : Traitements immunothérapeutiques. (A)** Dans le modèle de nucléation, les souris Tg30tau et souris non-transgéniques issues de mêmes portées, âgées de 1 mois, sont immunisées (Abs A, D ou isotype, 30 mg/kg) une semaine et 24 h avant l'injection intracérébrale d'homogénat de cerveau Alzheimer (h-AD, 2  $\mu$ l, 5,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) ou de PBS (2  $\mu$ l) dans la région CA1 de l'hippocampe droit. Le traitement immunothérapeutique se poursuit ensuite de manière hebdomadaire pendant 4 semaines et les souris sont sacrifiées 5 semaines post-injection. **(B)** Dans le modèle de propagation, les souris htauP301L âgées de 4 mois sont immunisées (Abs D ou isotype, 30 mg/kg) 24 heures avant l'injection intracérébrale de fibrilles P301L-K18 (1  $\mu$ l, 5  $\mu$ g/ $\mu$ l) ou de PBS (1  $\mu$ l) dans l'hippocampe droit. Les injections intrapéritonéales d'anticorps se poursuivent ensuite de manière hebdomadaire pendant 6 semaines puis les animaux sont sacrifiés 24h après la dernière injection.

## **Préparations des extraits de cerveaux Alzheimer –**

Des échantillons de cerveaux humains témoins ou Alzheimer (patients présentant des stades de Braak de niveau 6, prélevés dans le cortex frontal, zone de Brodmann 10) ont été obtenus via la neurobanque de Lille (conformément aux critères de la loi française sur les ressources biologiques et déclarés aux autorités compétentes sous le numéro DC-2008-642). L'obtention des échantillons biologiques respecte le consentement du donneur, la protection des données et l'examen au préalable par un comité d'éthique. Enfin, les échantillons ont été gérés par la biobanque CRB/CIC1403, BB-0033-00030.

Pour la préparation des homogénats de cerveaux, les échantillons ont été homogénéisés sur glace à l'aide de potters en verre dans 5 volumes (p/v) de PBS stérile. Les lysats de cerveaux ont ensuite été soniqués (40 impulsions, amplitude 60%) puis centrifugés à 4 °C, à une vitesse de 3 000 g pendant 5 min. Le surnageant, débarrassé des débris cellulaires, a ensuite été aliquoté et conservé à -80 °C jusqu'à utilisation. L'extrait enrichi en PHFs préparé au départ du même patient que l'homogénat Alzheimer, a été réalisé comme décrit précédemment dans les travaux de Davies (Forest et al. 2013).

## **Fibrilles P301L-K18 –**

Le peptide P301L-K18 est composé des quatre régions de liaison aux microtubules de la protéine tau et présente la mutation P301L pro-agrégante, retrouvée au sein des démences FTDP-17 (Nacharaju et al. 1999) (Fig. 5.A). Le peptide P301L-K18 a été exprimé sous forme de protéines solubles à étiquette -His dans des bactéries E. coli en suivant des protocoles standards. Les culots cellulaires ont été lysés (PBS 10 mM, pH 7.4, NaCl 500 mM, Imidazole 20 mM, 1 U/ml de benzonase, 0,2 mg/ml de lysozyme, 1 comprimé inhibiteur de protéase de Sigma) puis l'étiquette -His a été clivée par la TEV protéase (Tobacco Etch Virus) avant purification des peptides P301L-K18 sur Ni-NTA (Qiagen, UK). L'étape finale de purification, consiste en une filtration sur gel Superdex 75 (GE-Healthcare, UK) dans du PBS 10 mM, à pH 7.4 contenant 138 mM de NaCl. En vue d'induire leur fibrillisation, les peptides P301L-K18 purifiés (66 mM) ont été incubés pendant 5 jours, à 37 °C, en présence d'héparine (266 mM). Les fibrilles P301L-K18 résultantes ont ensuite été centrifugées pendant 1 h à 100 000 g avant d'être remises en suspension puis soniquées dans de l'acétate d'ammonium (11 mM, pH 7). La présence de fibres a été confirmée par gel SDS-PAGE, fluorescence à la thioflavine T et microscopie électronique à coloration négative.

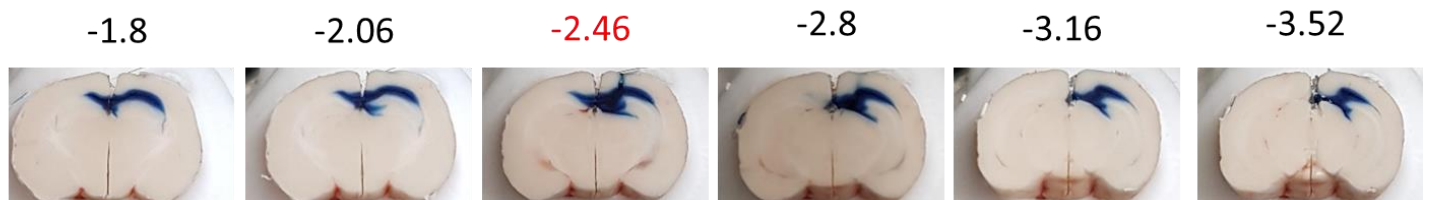
## Injections stéréotaxiques –

Le modèle de nucléation consiste en l'injection stéréotaxique d'un homogénat de cerveau issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (2  $\mu$ l, 5,5  $\mu$ g/ $\mu$ l), d'un extraits enrichis en PHFs (2 $\mu$ l, 1  $\mu$ g) ou de PBS (2  $\mu$ l), dans la région CA1 de l'hippocampe droit de jeunes souris Tg30tau anesthésiées (kétamine 100 mg/kg, xylazine 10 mg/kg). Dans ce modèle, l'injection stéréotaxique est effectuée aux coordonnées : antéro-postérieur: -2,5 mm; médio-latéral: -1 mm et dorso-ventral: -1,8 mm. (Fig. 2.A)

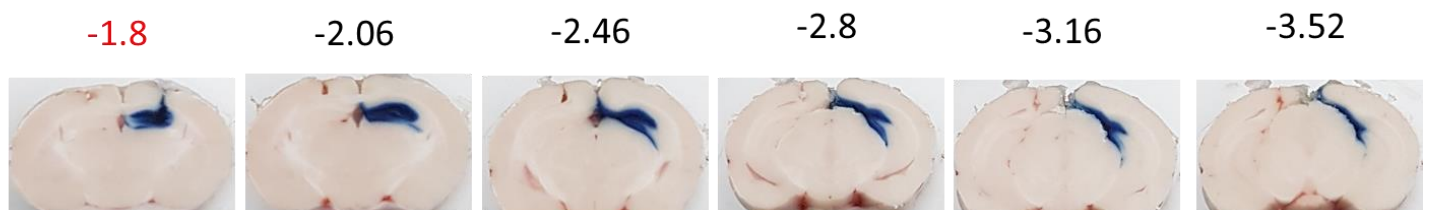
Le modèle de propagation consiste en l'injection de fibrilles P301L-K18 soniquées (1 $\mu$ l, 5  $\mu$ g/ $\mu$ l) ou de PBS (1 $\mu$ l) dans l'hippocampe droit de souris htauP301L anesthésiées (kétamine 50 mg/kg, médétomidine 0,5 mg/kg) aux coordonnées: antéro-postérieur: -1,8 mm; médio-latéral: -1,72 mm; dorso-ventral: -1,8 mm. (Fig. 2.B)

La procédure d'injection stéréotaxique consiste en l'administration du volume désiré (1 ou 2 $\mu$ l) à l'aide d'une seringue Hamilton de 10  $\mu$ l à une vitesse de 0,2  $\mu$ l/minute. A la fin de l'injection, l'aiguille est maintenue en position pendant 2.5 minutes avant d'être lentement remontée, pour éviter une perte de matériel au retrait de l'aiguille. Les coordonnées d'injection utilisées dans ces modèles ont été validées et les zones de diffusion du matériel injecté estimées, par injection stéréotaxique de blue Evans. (Fig. 2)

**A**



**B**



**Figure 2 : Validation des coordonnées stéréotaxiques d'injection.** Une solution de Blue Evans (1%) a été injectée dans l'hippocampe droit de souris Tg30tau âgées de un mois (n = 2) aux coordonnées ; antéro-postérieur: -2,5 mm, médio-latéral: -1 mm, dorso-ventral: -1.8 (A) *ET* dans l'hippocampe de souris HtauP301L, âgées de 4 mois (n = 2) aux coordonnées ; antéro-postérieur: -1,8 mm, médio-latéral: -1,72 mm, dorso-ventral: -1,8 mm (B). Les souris ont été sacrifiées par décapitation, 5 minutes après la fin de l'injection du Blue Evans. Une fois précautionneusement extraits, les cerveaux ont été directement congelés dans du 2-méthyl butane. Enfin, la diffusion du blue Evans au site d'injection a pu être observée par coupe progressive du cerveau dans le plan coronal à l'aide d'un cryostat. Des photographies de six bregmas couvrant la totalité de l'hippocampe (Bregma -1,7 à -3,52) sont présentées en vue d'illustrer les zones de diffusion. Les bregmas indiqués en rouge font référence aux bregmas antéro-postérieurs des 2 coordonnées d'injection.

## **Préparation des tissus, immunohistochimie, immunofluorescence et quantification –**

### **Préparation des tissus**

Au terme des différents traitements immunothérapeutiques (5 semaines après l'injection stéréotaxique dans le modèle de nucléation ; 6 semaines et 24h dans le modèle de propagation), les souris ont été profondément anesthésiées avant d'être perfusées par voie intracardiaque. Les animaux ont d'abord été perfusés avec une solution saline (0,9% de NaCl, 4°C) pour extraire le sang de la circulation puis avec du paraformaldéhyde 4% en vue de fixer les tissus. Ce mode de sacrifice, utilisé en cas d'analyses immunohistochimiques, implique une voie d'entrée dans la circulation sanguine des solutions de perfusions via le ventricule gauche et une voie sortie via l'oreillette droite préalablement incisée. Une fois la perfusion terminée, les cerveaux sont extraits puis post-fixés une nuit à 4°C dans du paraformaldéhyde 4%. Enfin, les cerveaux sont lavés dans du PBS puis incubés 24h dans du PBS contenant 20% de sucrose avant d'être congelés (1 minute dans du méthyl-butane entre -30 et 40°C). A l'aide d'un microtome cryostat, les cerveaux ont ensuite été découpé selon le plan frontal/coronal pour former des séries de coupes flottantes d'une épaisseur de 40 µm.

## Immunohistochimie

En vue d'évaluer l'étendue des tauopathies en regard des différents traitements immunothérapeutiques, des marquages immunohistochimiques ont été réalisés avec l'anticorps AT8 (Ser202, pThr205, pSer208) ciblant des espèces hyperphosphorylées de tau (modèle Tg30 et hTauP301L) et l'anticorps AT100 (pThr212, pSer214) reconnaissant spécifiquement les formes agrégées (modèle Tg30).

Dans le modèle de nucléation (Tg30), les coupes de cerveaux ont été lavées et perméabilisées dans du PBS contenant 0,2% de Triton X-100 puis traitées pendant 30 minutes avec 0,3% d' $H_2O_2$ . En vue d'éviter une liaison non-spécifique des anticorps, les tissus ont été incubés avec le réactif «Mouse in Mouse» (1: 100 dans du PBS, Vector Laboratories) pendant 60 minutes. Après, les coupes ont été mises au contact d'un anticorps primaire (AT8 1/400 ; AT100 1/1000) dilué dans du PBS-0,2% de Triton X-100, sous agitation pendant une nuit à 4 °C. Après plusieurs lavages, les coupes ont été incubées pendant 60 min, avec un anticorps secondaire ; IgG anti-souris biotinylé (1: 400 dans du PBS-0,2% Triton X-100, Vector) puis le marquage a été amplifié par incubation en présence de complexes « avidine-biotine-HRP » (kit ABC, 1: 400 dans du PBS, vecteur). Enfin, après lavages, l'immunomarquage a été révélé par incubation avec de la DAB (tétrachlorhydrate de diaminobenzidine, 0.5 mg/ml, vecteur) diluée dans du Tris-HCl (0,1 M, pH 7.6), en présence de 0.075% d' $H_2O_2$ . Les coupes de cerveaux ont ensuite été rincées à l'eau milli-Q, montées sur lames puis séchées à l'air libre. Les tissus ont finalement été contre-colorés pendant 1 minute dans une solution à 0,5% de crésyl violet, ont été rincés dans un bain à 2% d'acide acétique puis déshydratés par passages successifs dans une série de bains d'alcool (70%, 95%, 100%) et de toluène. Un milieu de montage a alors été utilisé (Vectamount ; Vector Laboratories ou Permout ; Fisher) pour déposer et fixer des lamelles couvre-objet protectrices par-dessus les coupes de cerveaux.

Le protocole d'immunohistochimie employé dans le modèle de propagation (hTauP301L), est relativement proche, à l'exception, de l'utilisation d'un anticorps AT8 pré-biotinylé (1/30 000). L'utilisation de cet anticorps primaire biotinylé permet un immunomarquage plus direct, ne demandant pas d'incubation en présence d'un anticorps secondaire biotinylé avant de pouvoir réagir au contact des complexes « avidine-biotine-HRP » contenus dans le kit ABC.



## Immunofluorescence

Dans le cadre de l'étude pilote de validation du modèle de propagation, le marquage des protéines tau hyperphosphorylées reconnues par l'anticorps AT8 a été effectué en immunofluorescence. Les coupes de cerveaux ont été lavées et perméabilisées dans du PBS-0.3% de Triton X100 puis incubées pendant 12 h à température ambiante avec l'anticorps AT8 biotinylé (1/500) dilué dans du PBS-Triton contenant 5% de sérum de chèvre. Le marquage AT8 a ensuite été visualisé après 1 h d'incubation à température ambiante en présence du fluorochrome Alexa Fluor 546 conjugué à la streptavidine (S11225, Invitrogen, 1/500). Enfin, les noyaux cellulaires ont été marqués grâce à une contre-coloration avec du DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole, 300 nM) et après montage, les lames ont été scannées par microscopie à fluorescence à l'objectif 20x en utilisant le NanoZoomer-XR (Hamamatsu).

## Quantification

En vue de quantifier les protéines tau pathologiques révélées par immunohistochimie, des images de très haute résolution des coupes de cerveaux ont été générées par microscopie à l'aide d'un scanner de lames (Axioscan Z1-Zeiss) à l'objectif 20x.

Dans le *modèle de nucléation*, le marquage présent au sein des coupes de cerveaux de souris Tg30tau a été quantifié à l'aide d'un logiciel de stéréologie (système d'analyse d'images Mercator; Explora Nova, La Rochelle, France) utilisant la teinte, la saturation et l'intensité pour distinguer les objets marqués. Les seuils ont été établis manuellement sur base de régions contrôles positivement et négativement marquées. Une fois définis, les seuils sont restés constants pour l'ensemble des quantifications. Au vu de la répartition systématique et localisée du marquage dans la CA1 de l'hippocampe, cette région a été choisie comme zone de quantification. Nous avons sélectionné 6 bregmas cérébraux uniformément répartis sur l'entièreté de l'hippocampe (bregmas -1,7, -2,06, -2,46, -2,80, -3,16, -3,52) pour lesquels, la surface immunomarquée au sein des régions CA1 ipsi- (droite/injectée) et contralatérale (gauche) a été quantifiée, à l'aide du logiciel Mercator.

Dans le *modèle de propagation* (hTauP301L), les scans haute résolution ont été analysés avec le logiciel VisioPharm 6 utilisant un algorithme bayésien linéaire en regard des seuils de détection de marquage (également définis sur base de régions contrôles positivement et négativement marquées). Les coordonnées d'injection stéréotaxiques propres à ce modèle étant plus latérales que celles du modèle précédent, (axe médio-latéral : -1.72 versus -1), le marquage observés ne se restreindra pas aux régions CA1 mais s'étendra également au gyrus denté, aux régions CA2 et CA3 et la lacunosum-molecular layer. Cette répartition hippocampique plus vaste, explique l'augmentation de l'étendue de la zone de quantification à l'hippocampe entier dans ce modèle de propagation. La surface marquée

au sein des hippocampes ipsi- et controlatéral, a été calculée au départ de 20 bregmas cérébraux entre -2.06 à -3.64 mm.

Les pourcentages de surfaces marquées présentés pour ces 2 modèles, résultent systématiquement d'une normalisation de la surface immunomarquée au regard de la surface totale de la zone de quantification.

## **Extraction des protéines tau insolubles au sarkosyl –**

Dans le modèle de nucléation (Tg30), l'étendue des tauopathies en regard des différents traitements immunothérapeutiques a également été quantifiée de manière biochimique. Pour ce type d'analyses, basées sur un fractionnement des protéines tau solubles et insolubles en présence de sarkosyl, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Les cerveaux ont été immédiatement extraits et congelés dans du 2-méthylbutane. Les régions CA1 ipsilatérales ont été disséquées sous binoculaire au départ de tranches de cerveaux réalisées à l'aide d'une matrice pour cerveau (World Precision Instruments, Sarasota, FL). L'extraction au sarkosyl effectuée s'est basée sur un protocole précédemment décrit (D'Orange et al. 2018). Une fois disséquée, chaque CA1 a été reprise et homogénéisée sur glace dans 100µl de tampon Tris (10 mM, pH 7,6) contenant des inhibiteurs de protéase (Complete, Roche, France) et 10% de sucrose. Les homogénats de CA1 ont ensuite été dosés en protéines puis dilués pour s'ajuster à la concentration protéique la plus basse. Du tampon Tris contenant 0,23% de Triton a ensuite été ajouté à 100µl des homogénats de concentration ajustée. Les échantillons ont ensuite été soniqués puis centrifugés à 4 °C pendant 10 min à 5 000 g pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré puis ultracentrifugé à 100 000 g pendant 1 h à 4 °C. Le surnageant résultant (S1) a été mis de côté et le culot remis en suspension dans du tampon Tris contenant 1% de sarkosyl. Une fois au contact du sarkosyl, les échantillons ont de nouveau été soniqués avant de subir une dernière ultracentrifugation d'une heure (100 000 g, 4 °C). Le surnageant résultant (S2) est isolé et représente la fraction contenant les protéines tau solubles en présence de sarkosyl et le culot, contenant les protéines tau insolubles au sarkosyl est remis en suspension, puis soniqué une dernière fois, dans 100 µl de LDS 2X (Lithium Dodecyl Sulfate). Les surnageants S1 et S2 sont dilués dans 3X LDS.

## **Analyse par Western blot –**

Après dénaturation, les échantillons sont déposés sur des gel NuPAGE® Bis-Tris 4-12% (Invitrogen), puis transférés après migration sur des membranes de nitrocellulose (0,45 µm) ou de PVDF (AT8), grâce au système Novex de Life Technologies (module de transfert XCell II™). La membrane est ensuite saturée ou non pendant 1 heure à température ambiante, avant d'être mise au contact de l'anticorps primaire (une nuit à 4 °C). Après lavage, la membrane est ensuite incubée pendant une heure avec un anticorps secondaire approprié couplé à l'HRP (Horseradish Peroxidase). Enfin, le signal est visualisé en utilisant les réactifs de détection Western Blot ECL (GE Healthcare). Pour les informations relatives aux dilutions et solutions de saturation propres à chaque anticorps, se référer à la table 1.

## **Analyse statistique –**

Dans les deux modèles, toutes les étapes expérimentales, y compris la quantification de l'ampleur des tauopathies au sein des différents groupes, ont été réalisées à l'aveugle. Les données d'immunohistochimie sont présentées sous le format « moyenne ± SEM » (standard error of the mean/écart-type). La normalité au sein des groupes a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. En cas de distribution normale, les tests statistiques réalisés consistent en des tests t de Student. Les groupes de distribution non gaussienne ont été analysés au départ de tests U de Mann Whitney en cas de. Les tests statistiques ont été effectués en bilatéral avec un niveau de significativité inférieur à 5% ( $p$ -value < 0,05). Les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS, version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC).

## **Modèle d'agrégation de protéines tau recombinantes in vitro –**

La cinétique d'agrégation de la protéine tau 2N4R (10 µM) est mesurée in vitro dans un tampon MES (50 mM, pH 6.9, NaCl 30 mM, EDTA 2.5 mM, DTT 0.33 mM) en présence d'héparine H3 (2.5 mM), de Thioflavine T (50µM) et de concentrations croissantes (0 à 10µM) en anticorps A et D ciblant la protéine tau ou anticorps isotype témoin, ciblant la forme humaine du TNF-α. Les expériences ont été réalisées à 37 °C sous agitation, en triplicates et au départ de 3 lots distincts d'anticorps. Les mesures de l'émission de fluorescence de la thioflavine T (proportionnelle à la présence de fibres) ont été enregistrées au départ d'un lecteur de plaques PHERAstar toutes les 5 minutes pendant une cinétique de 16 heures.

## **Microscopie électronique –**

En plus de suivre l'apparition de fibres au regard de l'émission de fluorescence de la thioflavine, l'effet du blocage potentiel de la formation de fibrilles de tau par les anticorps, a été visualisé par microscopie électronique. Une expérience similaire à celle du «test d'agrégation in vitro» a été réalisée en présence de la plus forte concentration en anticorps (10  $\mu$ M) pendant un temps d'incubation de 16 heures. Quelques microlitres ont été déposés pour chaque condition sur des grilles recouvertes de formvar/carbone pendant 1 min et ont été séchées à l'air libre pendant une nuit. Les grilles ont ensuite été colorées à l'acétate d'uranyle (1%) pendant 2 min en vue de visualiser les fibrilles de protéines tau en microscopie électronique (Zeiss modèle 901).

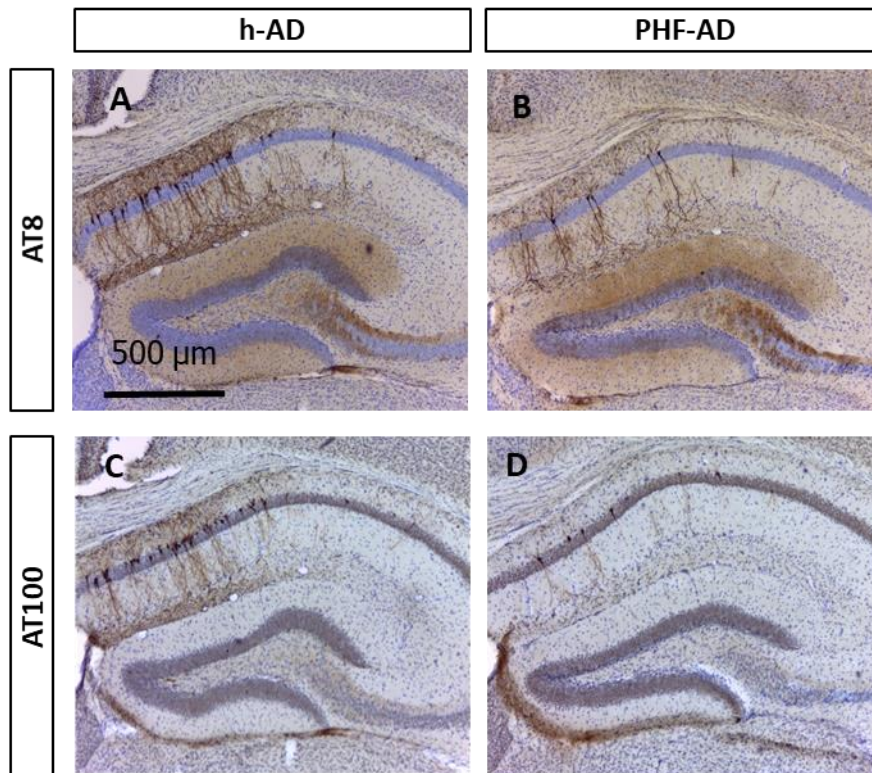
# Résultats

## CHAPITRE 1 : modèle de nucléation

- I. *Un homogénat de cerveau humain issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer est en mesure d'induire la nucléation et la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires au départ de protéines tau humaines mutées, exprimées dans le cerveau de jeunes souris Tg30tau*

En vue d'étudier le phénomène de recrutement et de nucléation observés en présence de protéines tau pathologiques, nous avons développé un modèle basé sur l'injection d'un homogénat de cerveau humain issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer, dans l'hippocampe droit de souris Tg30tau âgées de 1 mois. À cet âge, la pathologie tau intrinsèque à ces souris transgéniques n'est pas encore détectée (Leroy et al. 2007).

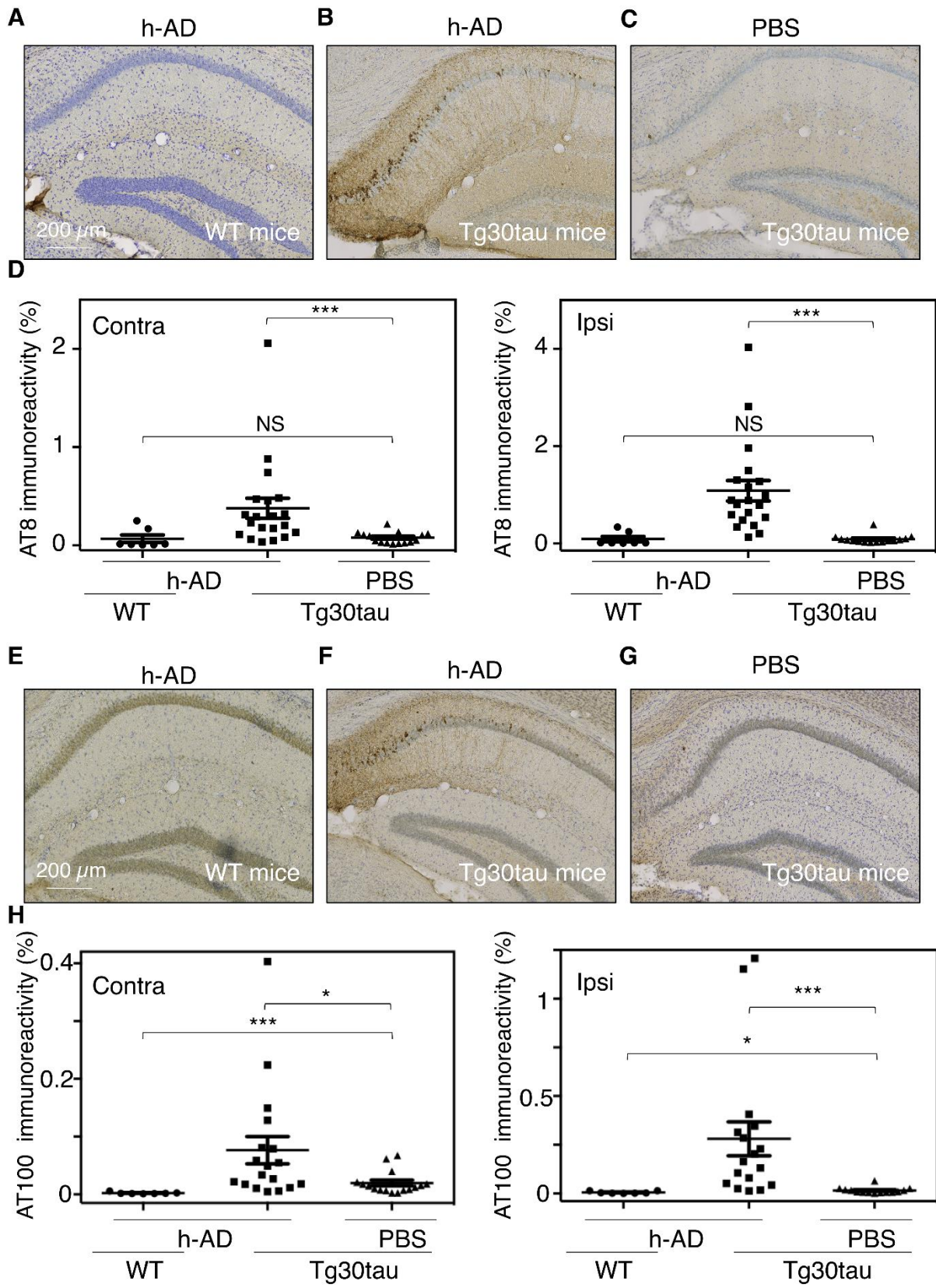
Dans un premier temps, nous avons comparé les propriétés d'agent de nucléation associées à un extrait enrichi en PHFs (PHF-AD) (Forest et al. 2013) et un homogénat (h-AD), tous deux préparés au départ d'un même échantillon de cerveau de patient Alzheimer. (Fig. 3) L'homogénat et la fraction enrichie en PHFs ont été injectés dans l'hippocampe droit de jeunes souris Tg30tau âgées de 1 mois. Leur capacité respective à induire une pathologie tau été comparée par immunohistochimie en utilisant des anticorps AT8 (tau hyperphosphorylée ; résidus pSer202, pThr205 et pSer208) (Fig. 3.A et 3.B) et AT100 (tau agrégée ; résidus pThr212, pSer214) (Fig. 3.C et 3.D).



**Figure 3 : Sélection de l'extrait Alzheimer associé aux meilleures propriétés d'amorces.** Un homogénat de cerveau Alzheimer (**A, C**) (h-AD, 2  $\mu$ L, 5,5  $\mu$ g/ $\mu$ L, n = 2 souris) ou une fraction enrichie en PHFs (**B, D**) (PHFs, 2 $\mu$ l, 1  $\mu$ g, n = 2 souris) ont été injectés dans l'hippocampe droit de souris Tg30tau âgées de un mois. Cinq semaines post-injection, les animaux ont été sacrifiés et une immunohistochimie a été réalisée au départ des anticorps AT8 (**A, B**) et AT100 (**C, D**). Photos illustrant les formes pathologiques au sein de l'hippocampe injecté.

L'homogénat de cerveau Alzheimer semblant plus efficace que la fraction enrichie en PHFs pour induire une potentialisation de la pathologie tau, a été sélectionné comme source d'amorces dans ce modèle.

Pour confirmer la validité du modèle de nucléation, l'homogénat de cerveau Alzheimer (h-AD) (Fig. 4.B, F) ou du PBS (Fig. 4.C, G), ont été injectés dans la région CA1 droite de l'hippocampe de souris Tg30tau âgées de 1 mois. L'apparition de la pathologie tau a été quantifiée 5 semaines plus tard par immunohistochimie. Pour s'assurer que la tauopathie observée ne reflète pas une capture du matériel injecté mais est le résultat d'un phénomène de nucléation des protéines tau humaines initié par l'injection des amorces AD, l'homogénat Alzheimer a également été injecté dans l'hippocampe de souris non-transgéniques, de type sauvage, issues de mêmes portées. (Fig. 4.A, E).



**Figure 4 : L'homogénat de cerveau de patient Alzheimer est en mesure de recruter et induire la nucléation des protéines tau humaines mutées exprimées dans les souris Tg30tau.** Un homogénat de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer (h-AD, 2  $\mu$ l, 5,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) ou du PBS (2  $\mu$ l) a été injecté dans l'hippocampe droit de souris Tg30tau âgées de 1 mois. Cinq semaines post-injection, les animaux ont été sacrifiés et une immunohistochimie a été réalisée au départ des anticorps AT8 et AT100. L'immunoréactivité AT8 détectée au site d'injection est illustrée pour des souris WT (A) et Tg30tau (B) injectées avec l'homogénat Alzheimer (h-AD) et pour une souris Tg30tau injectée avec du PBS (C). Pourcentage de surface AT8 positive dans les régions CA1 ipsi- et contralatérale. (D, souris Tg30tau injectées avec h-AD ou PBS : CA1 ipsilatérale  $p < 0.0001$  et contralatérale  $p = 0.0003$  - souris non-transgéniques (WT) injectées avec h-AD ou Tg30tau injectées avec PBS : CA1 ipsilatérale  $p = 0.0907$  et contralatérale  $p = 0.105$ ). L'immunoréactivité AT100 détectée au site d'injection est illustrée pour des souris WT (E) et Tg30tau (F) injectées avec l'homogénat Alzheimer (h-AD) et pour une souris Tg30tau injectée avec du PBS (G). Pourcentage de surface AT100 positive dans les régions CA1 ipsi- et contralatérale. (H, souris Tg30tau injectées avec h-AD ou PBS : CA1 ipsilatérale  $p < 0.0001$  et contralatérale  $p = 0.0136$  - souris non-transgéniques (WT) injectées avec h-AD ou Tg30tau injectées avec PBS: CA1 ipsilatérale  $p = 0.0277$  et contralatérale  $p = 0.0005$ ). Les pourcentages d'immunoréactivité (D et H) ont été quantifiés au départ de six coupes de cerveau couvrant la totalité de l'hippocampe (Bregma -1,7 à -3,52). Les données sont présentées sous forme de « moyenne  $\pm$  SEM » et analysées par des tests U de Mann Whitney ( $n = 7$  souris WT + h-AD,  $n = 15$  souris Tg30tau + h-AD,  $n = 13$  souris Tg30tau + PBS). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

L'apparition de formes pathologiques de tau dans les régions CA1 ipsi- et contralatérale suite à l'injection intracérébrale d'homogénat Alzheimer ou de PBS, a été analysée par immunohistochimie via une quantification des protéines tau hyperphosphorylées (AT8) et agrégées (AT100). En comparaison aux souris injectées avec du PBS (Fig. 4.C), les souris ayant reçu l'injection de l'homogénat Alzheimer (Fig. 4.B) se sont vu associées à une augmentation significative des protéines tau hyperphosphorylées (Fig. 4.D) dans la CA1 ipsilatérale (12 fois supérieure,  $p < 0,0001$ ) et contralatérale (5 fois supérieure,  $p = 0,0001$ ). La quantification des formes agrégées (AT100 positives) (Fig. 4H) en présence de l'injection d'amorces Alzheimer (Fig. 4F), démontre également une augmentation significative dans les CA1 ipsilatérale (18 fois supérieures,  $p < 0,001$ ) et contralatérale (3,8 fois supérieures,  $p = 0,0122$ ), en regard des animaux ayant reçus l'injection intracérébrale de PBS (Fig. 2G, H).

En conclusion, l'injection d'un homogénat de cerveaux Alzheimer dans la couche CA1 de l'hippocampe droit de souris Tg30tau âgées d'un mois, induit, 5 semaines p.i., l'apparition significative de formes hyperphosphorylées et agrégées de tau dans les neurones pyramidaux des régions CA1 ipsi- et contralatérale. En comparaison aux souris Tg30tau injectées en intracérébral avec du PBS, les souris de type sauvage ayant reçu l'injection d'homogénat Alzheimer, ne présentent aucune augmentation des formes AT8 positives (Fig. 4.D CA1 ipsilatérale,  $p = 0,0911$  et contralatérale,  $p = 0,106$ ) et sont même associées à une plus faible immunoréactivité AT100 (H CA1 ipsilatérale,  $p = 0,0238$  et



controlatérale,  $p < 0,0001$ ). Ces observations démontrent que les formes pathologiques détectées chez les souris Tg30tau injectées avec l'homogénat (h-AD), ne sont pas le résultat d'une capture du matériel injecté mais l'aboutissement d'un phénomène de recrutement des protéines tau humaines mutées au contact des amorces Alzheimer.

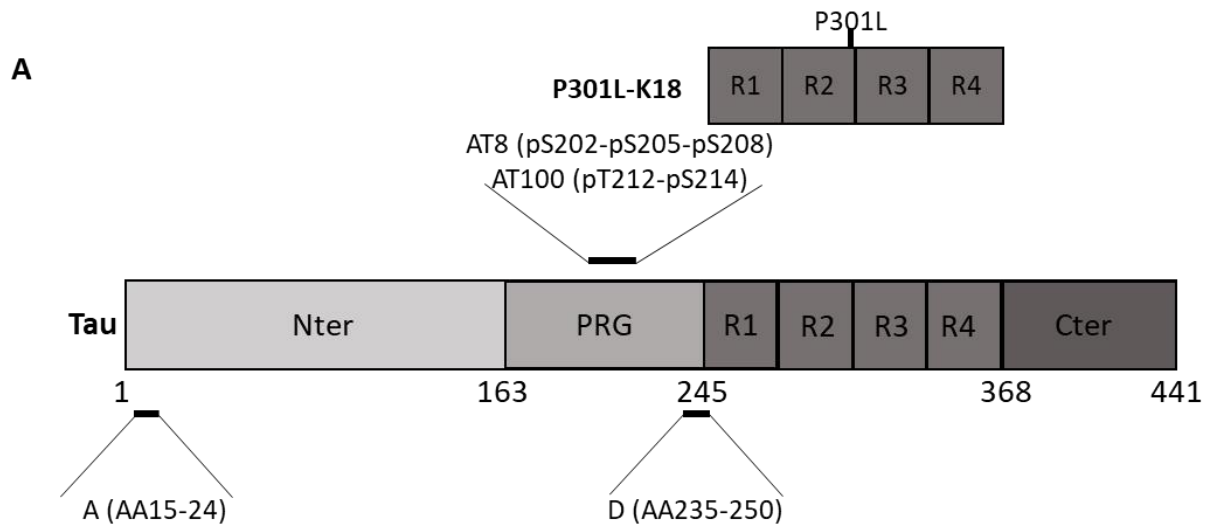
## II. *L'immunisation passive utilisant un anticorps dirigé contre la partie médiane de la protéine tau réduit plus fortement l'apparition de la tauopathie dans le modèle de nucléation qu'un anticorps ciblant la partie N-terminale*

### II.1 Caractérisation des anticorps anti-tau

L'immunisation passive a été réalisée au départ de deux anticorps murins d'isotype IgG1 dirigés contre la protéine tau (A Ab, D Ab) et un anticorps témoin négatif (isotype Ab) de même isotype mais reconnaissant la forme humaine du TNF $\alpha$  (protéine absente des souris Tg30tau) (Fig. 5.C). L'anticorps A murinisé (Ab A), déjà décrit dans la littérature, se lie à l'extrémité N-terminale de la protéine tau (acides aminés 15 à 24) et a été produit sur base du brevet WO 2014 / 028777A2 (Fig 5.A). L'anticorps D (Ab D), produit par UCB BioPharma, se lie à un épitope central (acides aminés 235-250), situé à l'entrée des domaines de liaison aux microtubules (Courade et al. 2018) (Fig. 5.A).

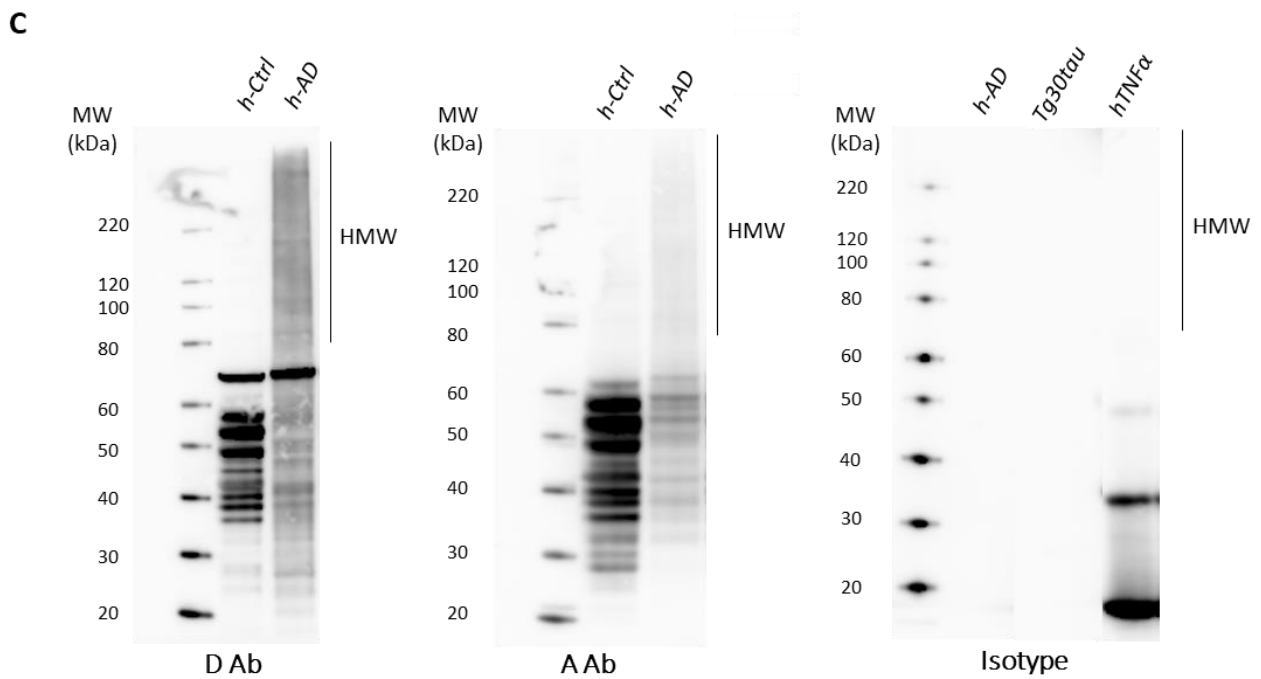
Parmi l'ensemble des anticorps auxquels ont été comparés l'Ab D, dans les études *in vitro* de Courade et collaborateurs, l'anticorps A est celui dont les affinités de liaisons, bien que supérieures, s'approchent le plus de celles de l'Ab D, tant pour les protéines tau monomériques que pour les PHFs-AD (Fig. 5.B). Désirant étudier l'impact potentiel de l'épitope ciblé sur la protéine tau lors de traitements immunothérapeutiques, en se détachant au maximum de l'implication potentielle de l'affinité des anticorps, l'Ab A a été retenu comme anticorps référent dans ces travaux, aux côtés de l'Ab D.

Les anticorps A et D, reconnaissant la protéine tau totale, sont en mesure de détecter les protéines tau contenues dans un homogénat cérébral, préparé au départ de cerveaux Alzheimer (h-AD) ou de cerveaux contrôles (h-Ctl) (Fig. 5C)



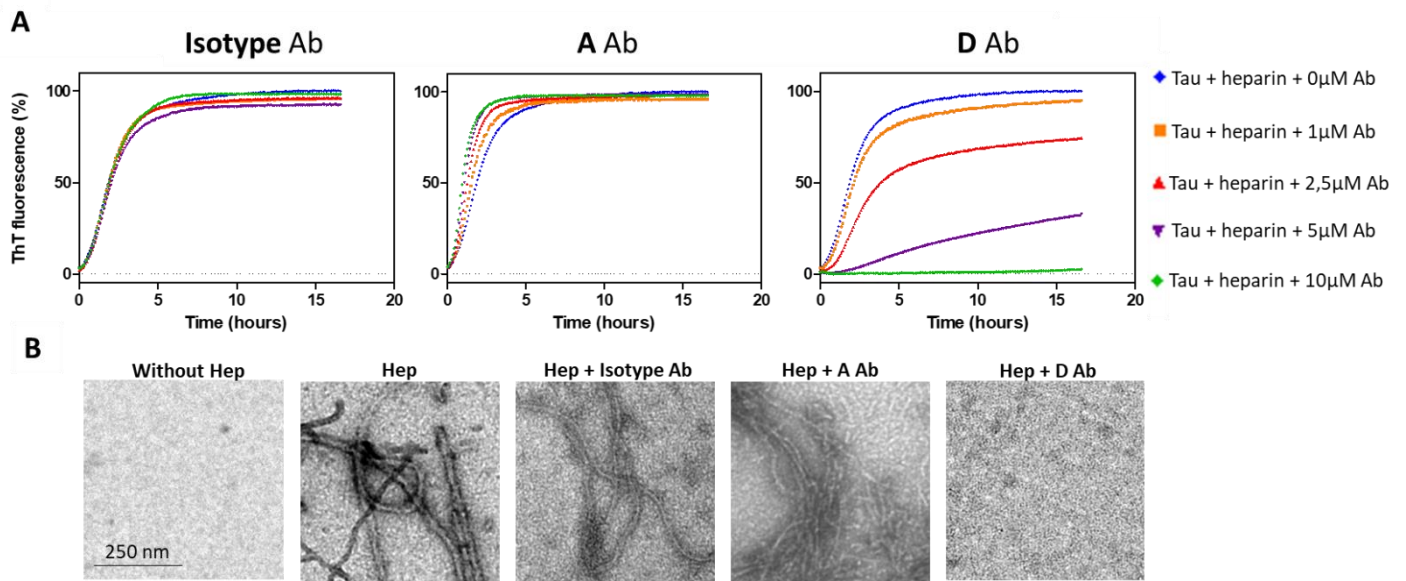
**B**

Antibody	Selectivity	Tau monomer			AD-PHF		
		ka (1/Ms) x 10 <sup>5</sup>	kd (1/s) x 10 <sup>-5</sup>	K <sub>D</sub> 1 (nM)	ka (1/Ms) x 10 <sup>5</sup>	kd (1/s) x 10 <sup>-5</sup>	K <sub>D</sub> (nM)
A	Total tau	3.6	5.2	0.16	2.3	2.5	0.12
D	Total tau	2.1	25.3	1.2	1.4	10.3	0.8



**Figure 5 : Caractérisation des anticorps anti-tau thérapeutiques.** Les épitopes (A) Les anticorps AT8 et AT100 ciblent respectivement les résidus « pS202, pT205, pS208 »(Malia et al. 2016) et « pT212-pS214 ». L'anticorps A cible la partie N-terminale de la protéine tau (acides aminés 15 à 24) tandis que l'anticorps D se lie à un épitope central, à l'entrée des domaines de liaison aux microtubules (acides aminés 235 to 250). Une représentation du peptide K18 portant la mutation P301L a été ajoutée au-dessus de la séquence de la protéine tau 2N4R. (B) Grâce à des études de résonance plasmonique de surface, les affinités de liaison des anticorps A et D pour des monomères de protéines tau et pour des PHFs Alzheimer purifiés, ont été déterminées. Les anticorps A et D sont, tous deux, en mesure de reconnaître à la fois les monomères et les PHFs-AD. Ces propriétés de liaison sont confirmées et illustrées par western blot. Modifié depuis la Figure 2 de (Courade et al. 2018) (C) 15µg d'homogénat de cerveau Alzheimer (h-AD), contrôle (h-Ctrl) ou de souris transgénique âgée (Tg30tau) et 2.5 µg de TNFα humain recombinant, ont été déposés sur gel d'acrylamide puis révélés en utilisant les anticorps A, D ou témoin isotype (anti-human TNFα).

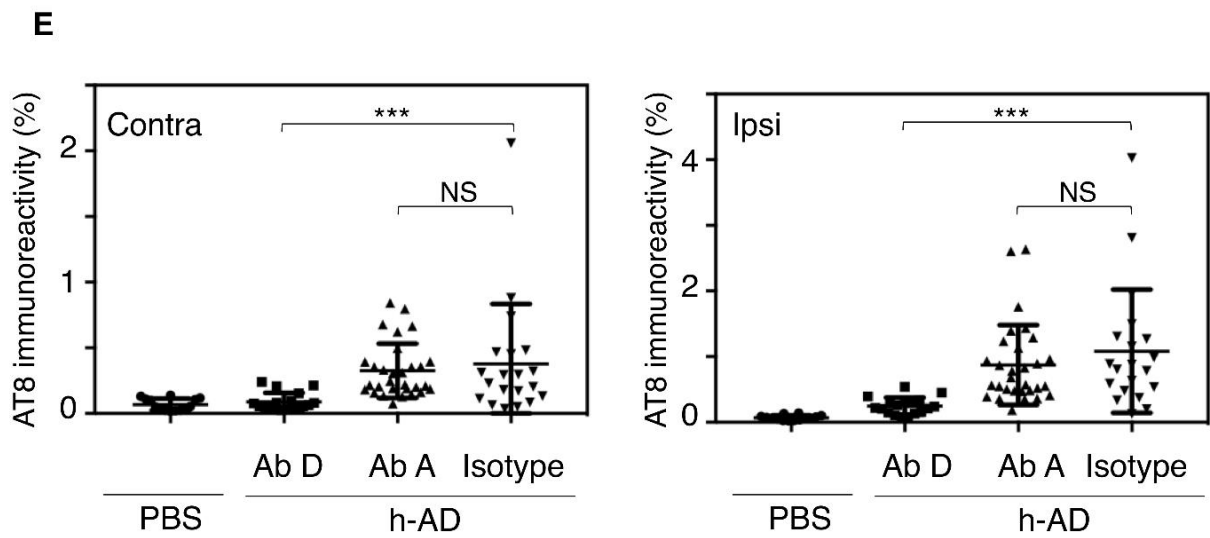
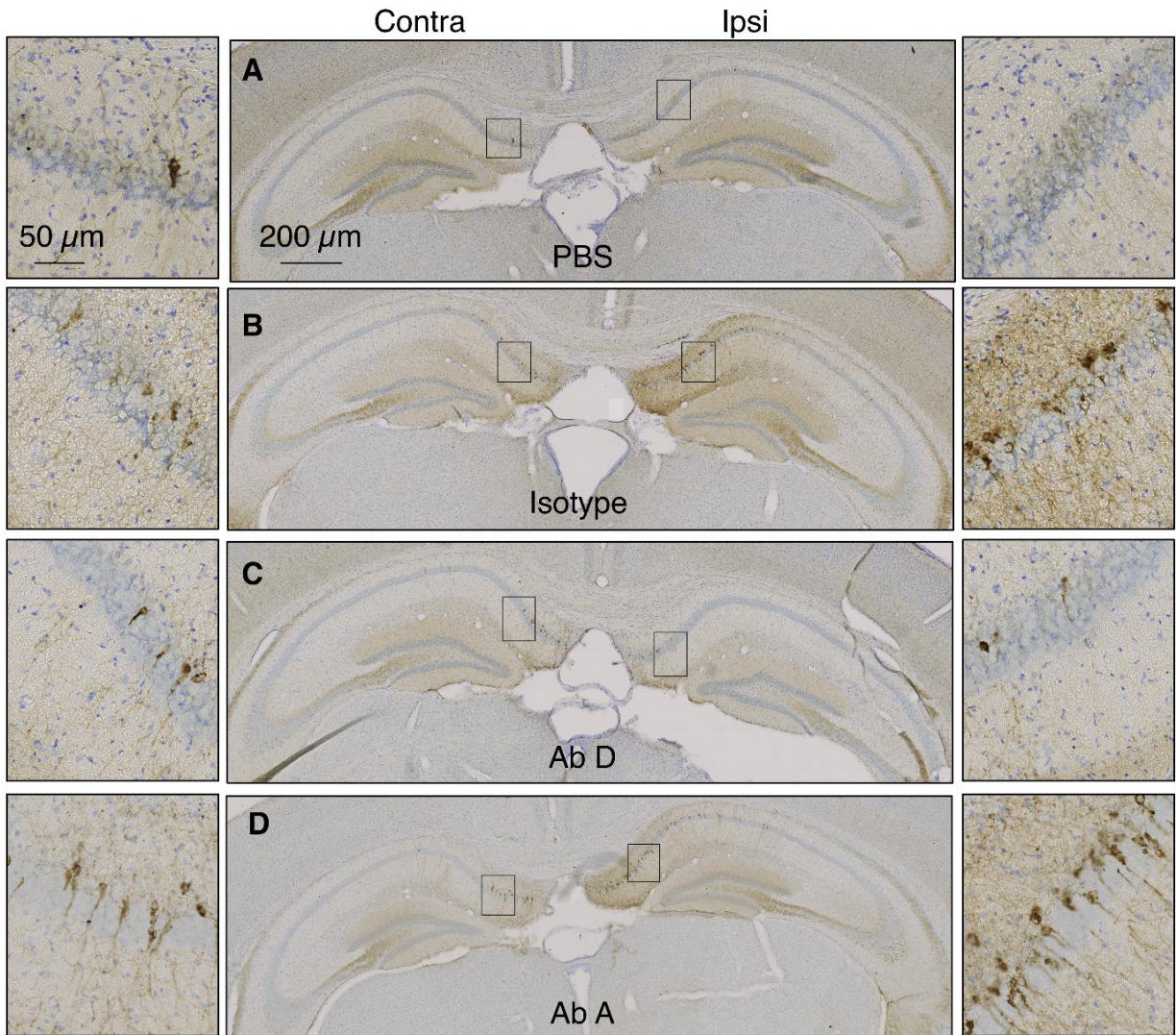
In vitro, les travaux de Courade et collaborateurs, ont montré que l'anticorps D était en mesure de bloquer efficacement la nucléation et agrégation intracellulaire induite par des amorces issues de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de démences fronto-temporales ou de paralysies supranucléaires progressives. Dans ce même modèle, l'anticorps A n'a pas été en mesure de prévenir l'agrégation (Courade et al. 2018). Des expériences *in vitro* ont été réalisées en vue de confirmer les capacités d'inhibition de l'agrégation propres aux anticorps A et D. En présence d'héparine, les protéines tau humaines solubles s'agrègent pour former des fibres. L'apparition des fibres de tau en solution peut être suivie par émission de fluorescence de la thioflavine T (Fig. 6.A). La présence en solution de concentrations croissantes en anticorps D permet de prévenir la formation de fibres (Fig. 6.A et 6.B). À l'opposé, les solutions de concentrations croissantes en anticorps A ou témoin isotype n'ont eu aucun effet inhibiteur sur l'apparition des fibres (Fig. 6.A et 6.B). Ces résultats sont en accord avec les données précédemment publiées (Courade et al. 2018).



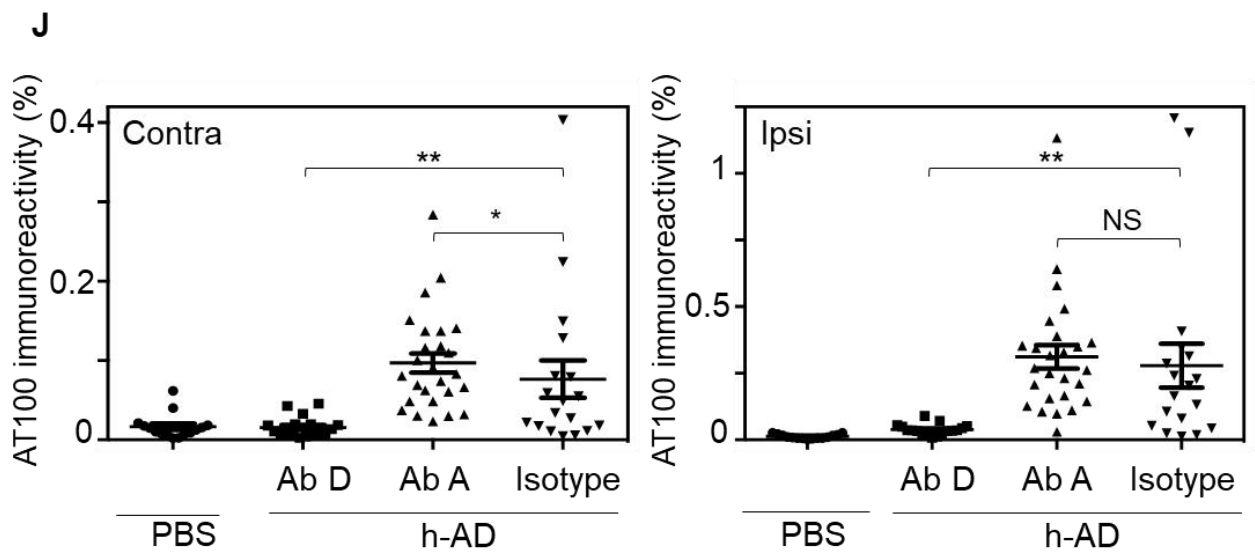
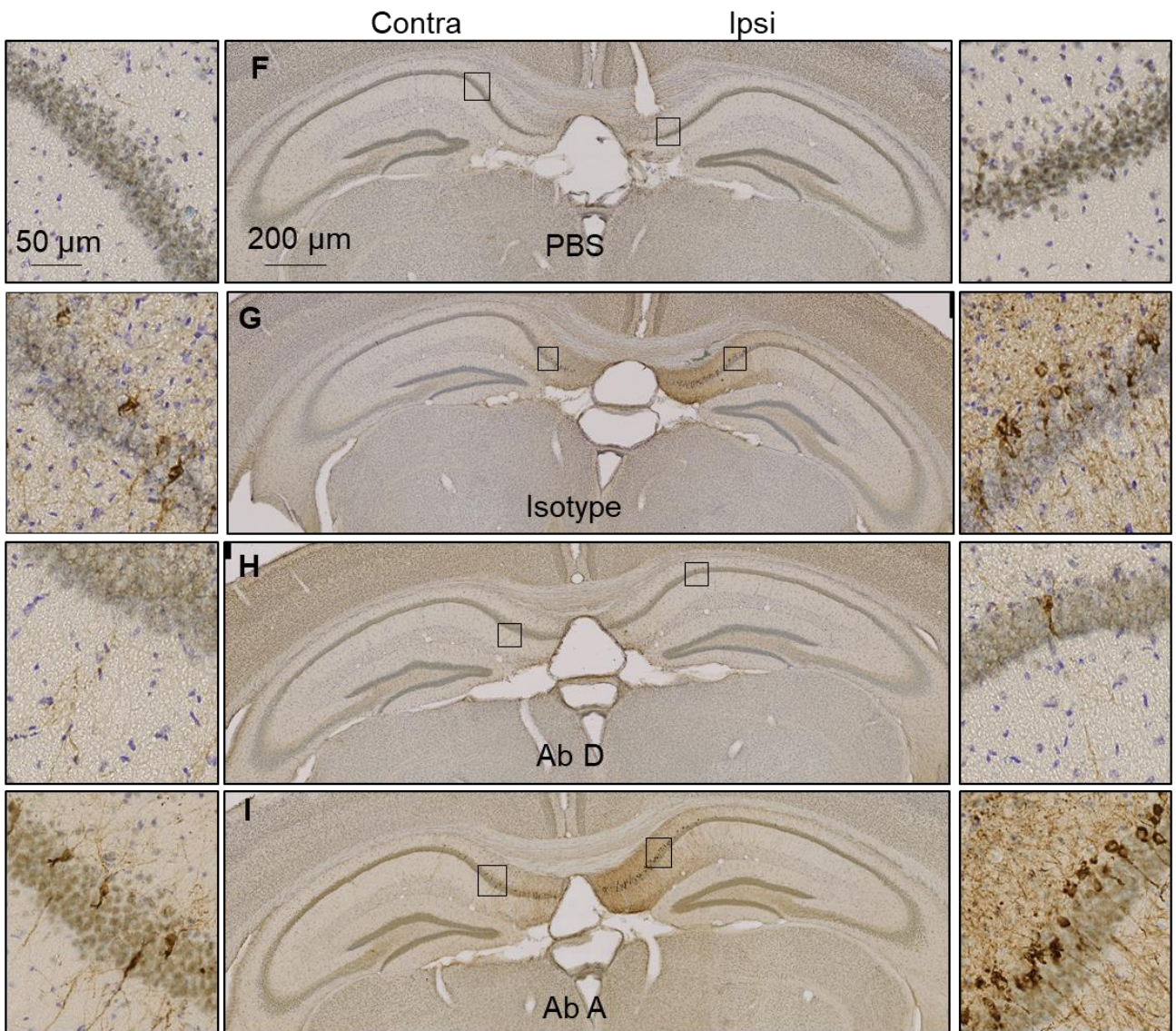
**Figure 6 : Capacité d'inhibition de l'activité de recrutement/nucléation des anticorps A et D.** *In vitro* (A), des protéines tau humaines 2N4R solubles (10 $\mu$ M) ont été incubées en présence de 2.5 mM d'héparine, 50  $\mu$ M de thioflavine T et des concentrations croissantes en anticorps A, D ou témoin isotype. L'émission de fluorescence de la thioflavine T, indicatrice de l'apparition de fibres, est présentée pour chaque anticorps à des concentrations de 0, 1, 2.5, 5 et 10 $\mu$ M sur une cinétique de 16h. (B) Pour un temps d'incubation de 16h en présence d'une concentration en anticorps de 10 $\mu$ M, la présence de fibres de tau a été analysée par microscopie électronique. (EM 901 Zeiss).

## II.2 Traitements immunothérapeutiques utilisant les anticorps A et D dans le modèle de nucléation

En vue de prévenir l'apparition des formes hyperphosphorylées et agrégées de tau dans les régions CA1 en réponse à l'injection intracérébrale d'homogénat Alzheimer, des traitements immunothérapeutiques en utilisant les anticorps A, D ou témoin isotype, ont été réalisés selon le protocole d'immunisation décrit dans le matériel et méthodes (Fig. 1.A). Les traitements thérapeutiques ont été réalisés sur des souris Tg30tau de 1 mois ayant reçu l'injection intracérébrale d'homogénat de cerveau Alzheimer (h-AD). Des souris Tg30tau ayant reçu l'injection intracérébrale de PBS ont été utilisées comme contrôle négatif relatif à la pathologie tau intrinsèque. A la fin de l'étude, l'ampleur des pathologies tau associées aux différents traitements immunothérapeutiques, a été quantifiée par immunohistochimie au départ des anticorps AT8 (Fig. 7 A-E) et AT100 (Fig. 7 F-J).







**Figure 7 : L'immunisation passive anti-tau s'oppose au recrutement/nucléation des protéines tau humaines induit par l'injection d'homogénat de cerveau Alzheimer.** Des souris Tg30tau âgées de 1 mois ont reçu des injections intrapéritonéales (IP à 30mg/kg) répétées d'anticorps A (A Ab) (**D, I**), D (D Ab) (**C, H**) ou d'un témoin isotype (Isotype) (**B, G**), 1 semaine puis 24h avant l'injection stéréotaxique de h-AD (**B-D, G-I**) dans la région CA1 droite. Les anticorps ont ensuite été de nouveau administrés par voie IP de manière hebdomadaire pendant 1 mois. Des souris Tg30tau injectées en intracérébral avec du PBS (**A, F**) ont été utilisées comme contrôle négatif. Les souris ont été sacrifiées 5 semaines post injection et les formes pathologiques de tau présentes au sein du cerveau ont été quantifiées à l'aide d'immunohistochimies au départ des anticorps AT8 (**A-D**) et AT100 (**F-I**). Les immunoréactivités AT8 (**A-D**) et AT100 (**F-I**) au bregma d'injection ont été illustrées. De part et d'autre de ces illustrations, se trouvent des agrandissements des régions de la CA1 délimitées d'un quadrant noir. Pourcentage de surface AT8 positive dans les régions CA1 ipsi- et contralatérale (**E**, souris Tg30tau traitées avec Ab D versus isotype, CA1 ipsilatérale  $p < 0.0001$  et contralatérale  $p = 0.0004$  – Tg30tau traitées avec Ab A versus isotype, CA1 ipsilatérale  $p = 0.482$  et contralatérale  $p = 0.535$ ). Pourcentage de surface AT100 positive dans les régions CA1 ipsi- et contralatérale (**J**, souris Tg30tau traitées avec Ab D versus isotype, CA1 ipsilatérale  $p = 0.0011$  et contralatérale  $p = 0.0068$  – Tg30tau traitées avec Ab A versus isotype, CA1 ipsilatérale  $p = 0.0784$  et contralatérale  $p = 0.0243$ ). Les pourcentages d'immunoréactivité (**E** et **J**) ont été quantifiés au départ de six coupes de cerveau couvrant la totalité de l'hippocampe (Bregma -1,7 à -3,52). Les données sont présentées sous forme de « moyenne  $\pm$  SEM » et analysées par des tests U de Mann Whitney ( $n = 15$  souris Tg30tau+PBS,  $n = 18$  souris Tg30tau+h-AD+Ab D,  $n = 23$  souris Tg30tau+h-AD+Ab A,  $n = 18$  souris Tg30tau+h-AD+isotype). \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

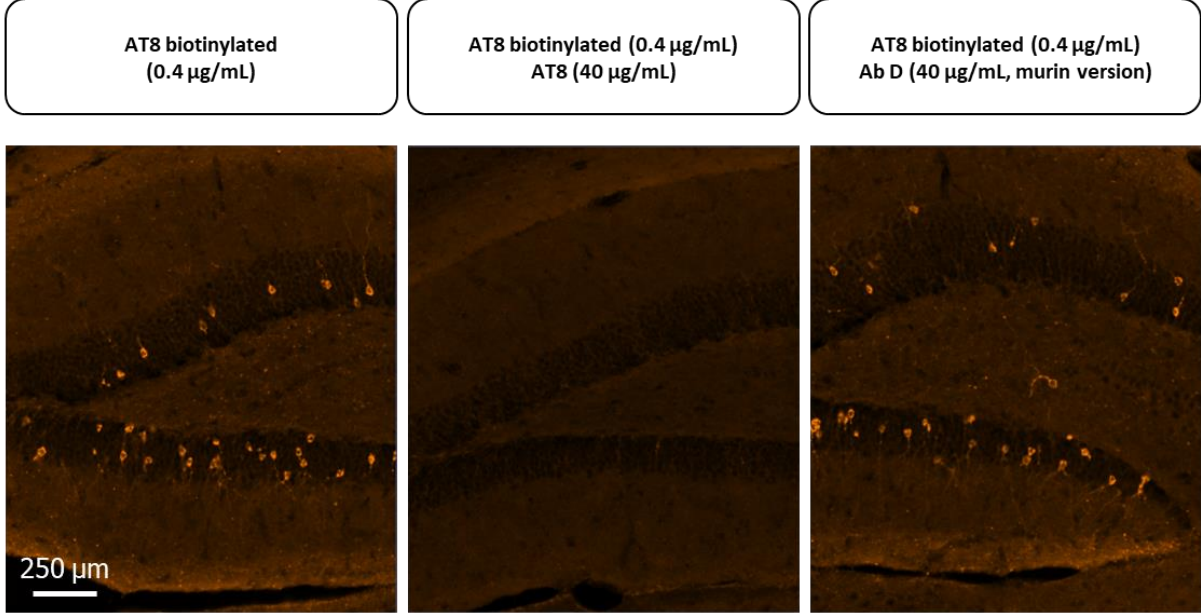
Dans les souris contrôles injectées PBS, une très faible immunoréactivité AT8 (Fig. 7A) est observée, tandis qu'aucune immunoréactivité AT100 (Fig. 7F) n'est détectée dans les CA1 ipsi- et contralatérales. Les souris Tg30tau ayant reçus l'injection intracérébrale d'homogénat Alzheimer en présence d'un traitement immunothérapeutique avec l'anticorps témoin isotype, démontrent une apparition significative d'espèces AT8- (Fig. 7.B) et AT100- (Fig. 7.G) positives dans les régions CA1 ipsi- et contralatérale. Une immunoréactivité plus importante est observée du côté ipsilatéral ayant reçu l'injection intracérébrale d'amorces Alzheimer.

En présence du traitement immunothérapeutique utilisant l'anticorps D, les immunoréactivités AT8 (Fig. 7C, E,  $p < 0,0001$ ) et AT100 (Fig. 7H, J,  $p = 0,0011$ ) ont été fortement réduites en regard de l'immunisation utilisant l'anticorps témoin (isotype Ab). Il est intéressant de noter que contrairement à l'anticorps D d'épitope central, le traitement immunothérapeutique utilisant l'anticorps A, ciblant l'extrémité N-terminale de la protéine tau, n'est pas en mesure de diminuer les immunoréactivités AT8 (Fig 2D, E,  $p = 0,485$ ) et AT100 (Fig. 2I, J,  $p = 0,0974$ ) non-différentes de celles observées en présence de l'anticorps témoin (isotype Ab).

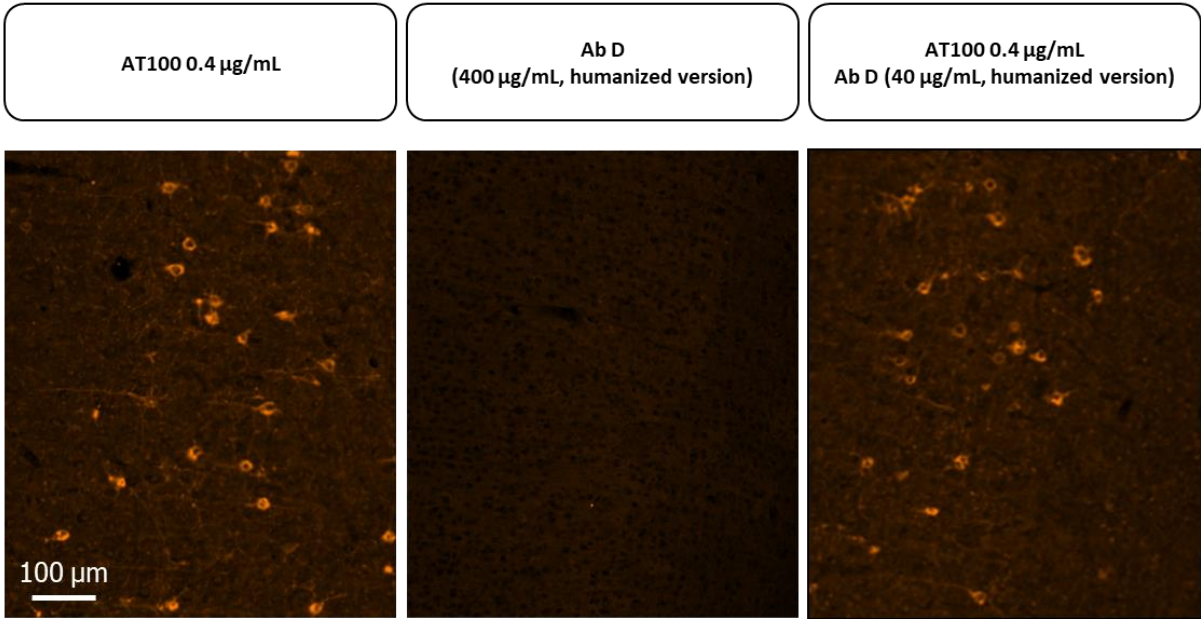
Ces résultats suggèrent que seule l'immunisation utilisant l'anticorps D (Ab D) est capable d'empêcher l'apparition de la tauopathie neurofibrillaire induite par l'injection intracérébrale de l'homogénat Alzheimer. Pour s'assurer que la réduction des immunoréactivités AT8 et AT100 observées en présence d'injections répétées de l'anticorps D, ne résulte pas d'un encombrement stérique causé par la liaison

de l'anticorps thérapeutique qui empêche la fixation des anticorps utilisés pour l'immunohistochimie, il a été démontré que la pré-incubation de coupes de souris transgéniques avec l'Ab D (40 µg/ml) n'affectait en rien la détection des immunoréactivités AT8 (Fig. 8.A) et AT100 (Fig. 8.B).

**A**



**B**





**Figure 8 : Etude de compétition de liaison entre l'anticorps thérapeutique D et les anticorps utilisés pour les immunomarquages.** Des protéines tau pathologiques (AT8 et AT100 positives) sont détectables dans des coupes d'hippocampe (**A**) ou de cortex (**B**) de souris htauP301L âgées. En vue d'étudier une compétition stérique potentielle entre l'anticorps D et l'anticorps AT8, des coupes ont été révélées en utilisant un anticorps AT8 primaire biotinylé (0.4 µg/ml, 1/250) avec (**A** image de droite) ou sans (**A** image à gauche) pré-incubation des coupes de cerveaux avec l'anticorps D (Ab D) en excès (40µg/ml). L'immunomarquage AT8 a été révélé en utilisant une streptavidine couplée à l'Alexa Fluor 546. Un contrôle interne (**A** image centrale) montre qu'une expérience de compétition similaire avec une pré-incubation avec la version non-biotinylée de l'anticorps AT8, éteint complètement le signal. Pour étudier la compétition potentielle entre l'anticorps D et AT100, les coupes ont été révélées en utilisant l'anticorps AT100 (0.4 µg/ml, 1/500) avec (**B** image de droite) ou sans (**B** image à gauche) pré-incubation des coupes de cerveaux avec la version humaine de l'anticorps D (Ab hD) en excès (40µg/ml). L'immunomarquage AT100 a été révélé en utilisant un anticorps secondaire anti-mouse, couplé à l'Alexa Fluo 546. Un contrôle interne (**B** image centrale) montre l'absence totale de reconnaissance de la forme humaine de l'anticorps D (Ab hD) par l'anticorps secondaire-Alexa546

En vue de confirmer ces résultats, une seconde expérience *in vivo* a été réalisée et l'ampleur des tauopathies en présence des différents traitements immunothérapeutiques a été évaluée par des approches biochimiques suite à un fractionnement soluble/insoluble au sarkosyl. Après dissection sous binoculaire puis extraction soluble/insoluble des CA1 ipsilatérales, pour chaque souris, un homogénat total de CA1 ainsi que les fractions soluble et insoluble au sarkosyl ont été déposés en western blots. Les membranes ont été révélées en utilisant des anticorps reconnaissant la protéine tau totale (Fig. 9.A-D, N-terminal, M19G) et deux épitopes pathologiques phospho-dépendant ; le résidu pSer396 (Fig. 9.E-H) et les résidus pThr212/pSer214 (AT100) (Fig. 9.I-L).

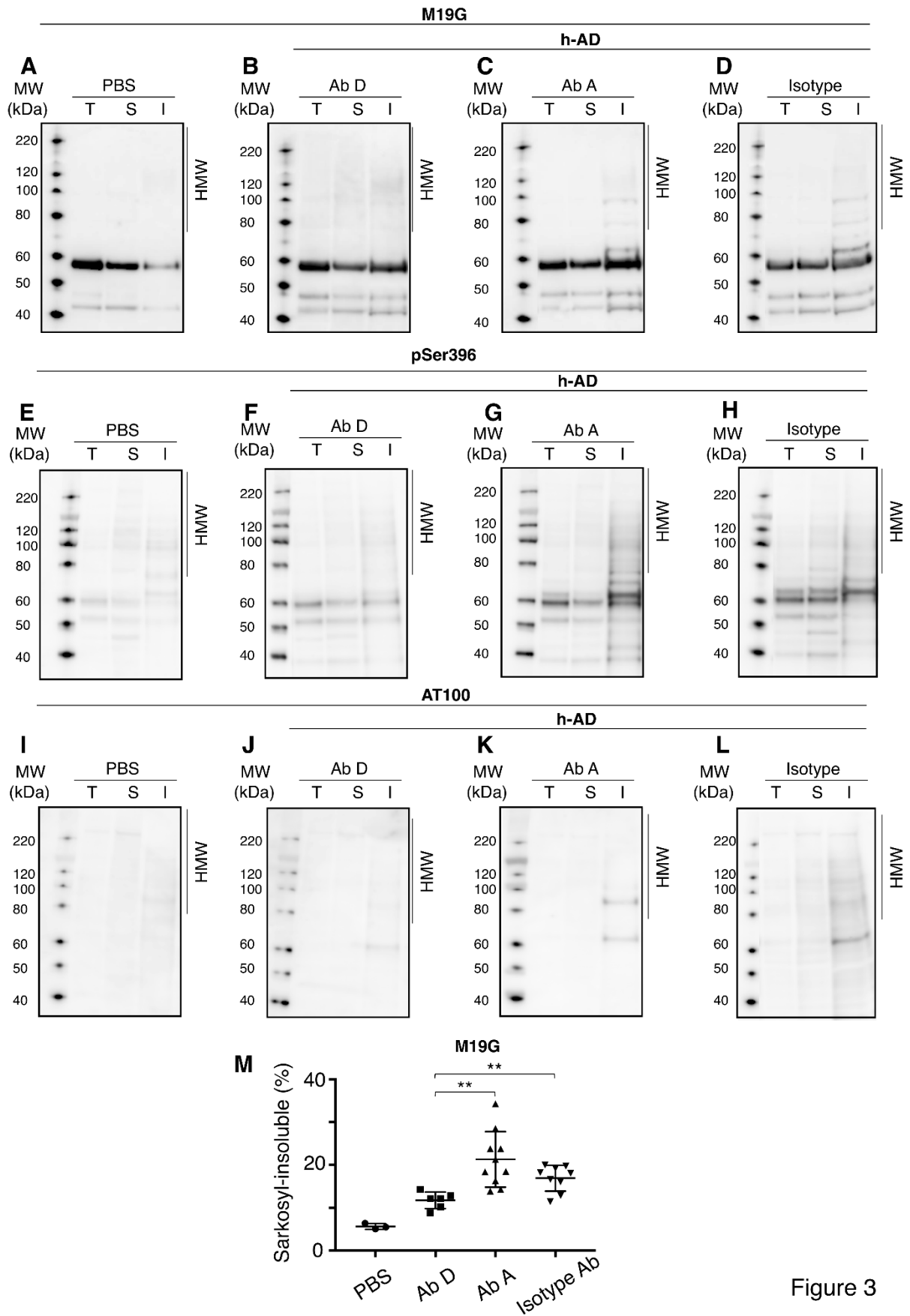


Figure 3

**Figure 9 : Baisse significative des espèces insolubles de haut poids moléculaires en présence du traitement immunothérapeutique utilisant l'anticorps D.** Des souris Tg30tau âgées de 1 mois ont reçu des injections intrapéritonéales (IP à 30mg/kg) répétées d'anticorps A (n=10) (C, G, K), D (n=6) (B, F, J) ou d'un témoin isotype (n=9) (D, H, L), 1 semaine puis 24h avant l'injection stéréotaxique d'h-AD (B-D, F-H, J-L) dans la région CA1 droite. Les anticorps ont ensuite été administrés par voie IP de manière hebdomadaire pendant 1 mois. Des souris Tg30tau injectée en intracérébral avec du PBS (n=5) (A, E, I) ont été utilisées comme contrôle négatif. Les souris ont été sacrifiées 5 semaines post injection et les formes pathologiques de tau présentes au sein du cerveau ont été révélées par western-blot suite à un fractionnement soluble insoluble au sarkosyl au départ des anticorps M19G (tau totale) (A-D), pSer396 (E-H) et AT100 (I-L). T=homogénat total, S=fraction soluble au sarkosyl, I=fraction insoluble au sarkosyl. (M) Quantification de l'immunoréactivité M19G dans la fraction insoluble au sarkosyl. Les données ont été analysées par des tests t non-pairés de student (n=6 souris Tg30tau+h-AD+Ab D, n=10 souris Tg30tau+h-AD+Ab A, n=9 souris Tg30tau+h-AD+isotype). Ab D versus isotype, (t)=-3.68, p=0.0028 - Ab D versus Ab A, (t)= 4.35, p=0.0011. \*\* p < 0.01.

Comme attendu, la fraction insoluble au sarkosyl est très faiblement détectée chez les souris contrôles ayant reçu l'injection intracérébrale de PBS (Fig. 9.A, E, I). Inversement, le groupe ayant été injecté en intracérébral avec l'homogénat de cerveau Alzheimer en présence du traitement immunothérapeutique témoin (Isotype Ab) (Fig. 9.D, H, L) démontre la présence d'espèces de haut poids moléculaire (HMW) pSer396- et AT100-positives, qui traduisent la présence de structures fibrillaires s'apparentant aux PHFs (Allen et al. 2002; Augustinack et al. 2002; Buée-Scherrer et al. 1996). Une autre observation est la baisse de ces protéines tau de haut poids moléculaire dans la fraction insoluble au sarkosyl des souris traitées avec l'anticorps D (Fig. 9.B, F, J) en regard des souris traitées au départ de l'isotype contrôle (Fig. 9.D, H, L) ou de l'anticorps A (Fig. 9.C, G, K). L'efficacité des traitements immunothérapeutiques a été déterminée sur base de la quantification des protéines tau présentes dans la fraction insoluble au sarkosyl révélée au départ de l'anticorps N-terminal M19G (Fig. 9.M, A-D). Cette quantification des espèces agrégées de haut poids moléculaire dans la fraction insoluble au sarkosyl a confirmé une réduction significative des espèces agrégées avec l'anticorps D en regard de l'anticorps témoin (Isotype Ab) (Fig. 9.M, p = 0,0028) et l'anticorps A (A Ab) (Fig. 9.M, p = 0,0011).

Ces résultats confirment ceux obtenus par immunohistochimie. Pour rappel, la quantification des pourcentages d'immunoréactivité AT8 (Fig. 7.E) et AT100 (Fig. 7.J), montre qu'en plus de prévenir l'apparition des formes pathologiques de protéines tau dans la CA1 ipsilatérale injectée, le traitement immunothérapeutique au départ de l'anticorps D est aussi en mesure de prévenir l'apparition des tauopathies AT8- (Fig. 7. E, C, p = 0,0004) et AT100-positives (Fig. 7.J, H, p = 0,0068) dans l'hémisphère contralatéral. L'hippocampe contralatéral étant un possible site de projection/propagation, la question s'est posée de savoir si, en plus de prévenir le développement de tauopathies au sein d'un modèle de

recrutement/nucléation, le traitement immunothérapeutique utilisant l'anticorps D, était également capable de s'opposer à la propagation de formes pathologiques de tau.

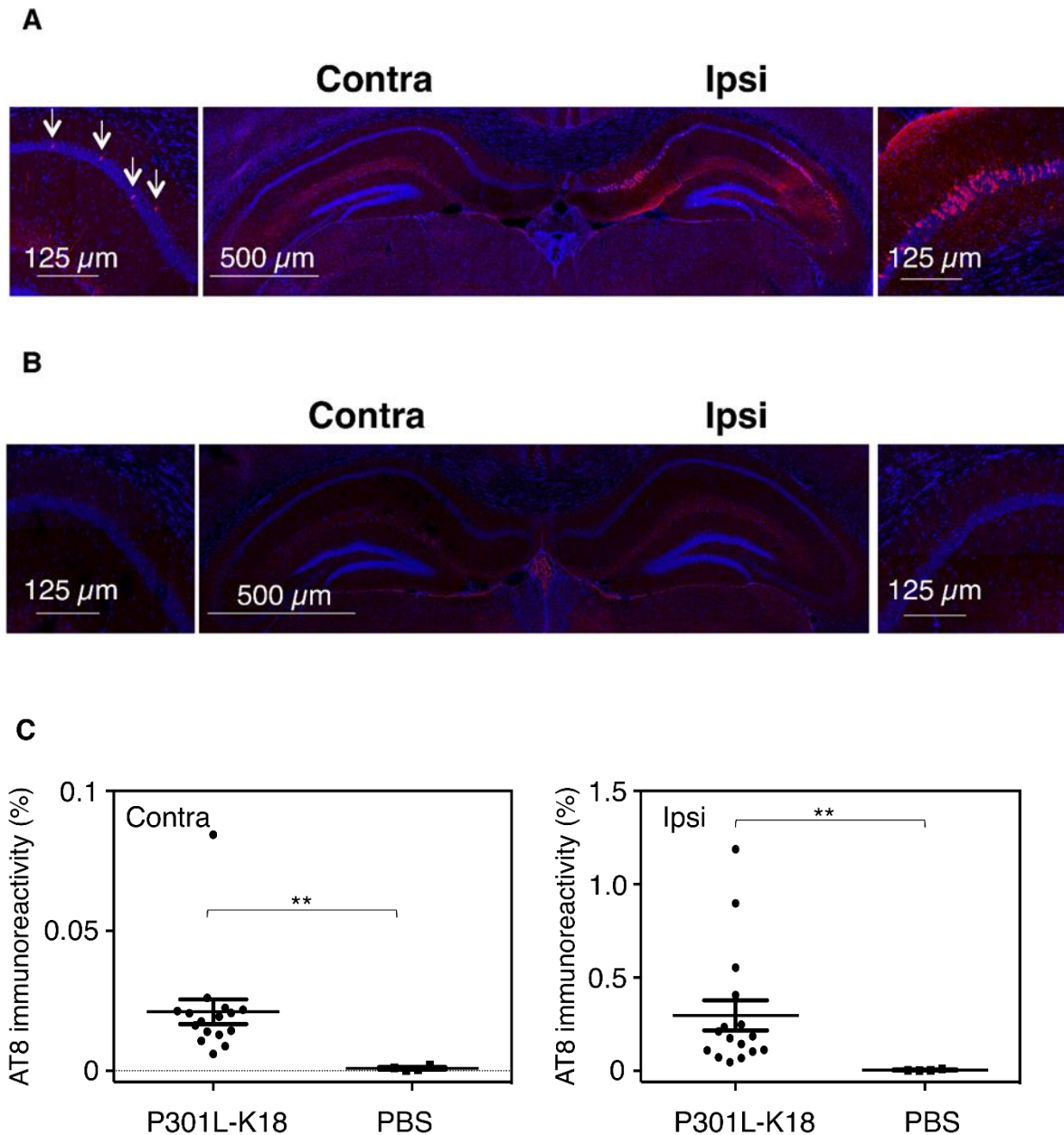
Deux facteurs nous empêchent d'utiliser ce modèle pour répondre à cette question. Au vu des coordonnées d'injection stéréotaxiques très médiales, il est indispensable de prendre en considération l'existence d'une diffusion potentielle de l'homogénat injecté de la CA1 ipsilatérale vers la CA1 contralatérale. Ce risque a été mis en évidence par l'injection stéréotaxique de blue Evans (Fig. 2.A). Du fait de la diffusion potentielle des amorces pathologiques dans l'hippocampe contralatéral en ces coordonnées d'injection, il est impossible, dans ce modèle, de considérer la CA1 contralatérale comme région de propagation. Le second facteur empêchant de conclure sur un effet potentiel de l'anticorps D sur la propagation dans ce modèle, est la capacité de l'anticorps thérapeutique à reconnaître l'homogénat de cerveau Alzheimer (Fig. 5.C). En effet, l'anticorps D étant en mesure de lier les amorces pathologiques contenues dans l'homogénat, il pourrait ralentir leur diffusion et internalisation au sein de la CA1 contralatérale. Une autre hypothèse en regard de la liaison des amorces extracellulaires à l'anticorps D, est la diminution de l'internalisation/capture des amorces au sein de la CA1 ipsilatérale qui explique la tauopathie fortement réduite au site d'injection et qui a pour conséquence une diminution de la propagation dans les régions de projections telle la CA1 contralatérale.

## **CHAPITRE II : Modèle de propagation**

En vue de définir avec certitude l'effet potentiel de l'anticorps D sur la propagation des tauopathies, un second modèle *in vivo* a été développé. Ce modèle est basé sur l'injection intra-hippocampique en un site plus latéral, de fibrilles P301L-K18 dans des souris transgéniques htauP301L. L'épitope de l'anticorps D étant situé en dehors du peptide K18, l'anticorps ne sera pas en mesure de lier et prévenir l'internalisation des fibres K18-P301L injectées (Fig. 11).

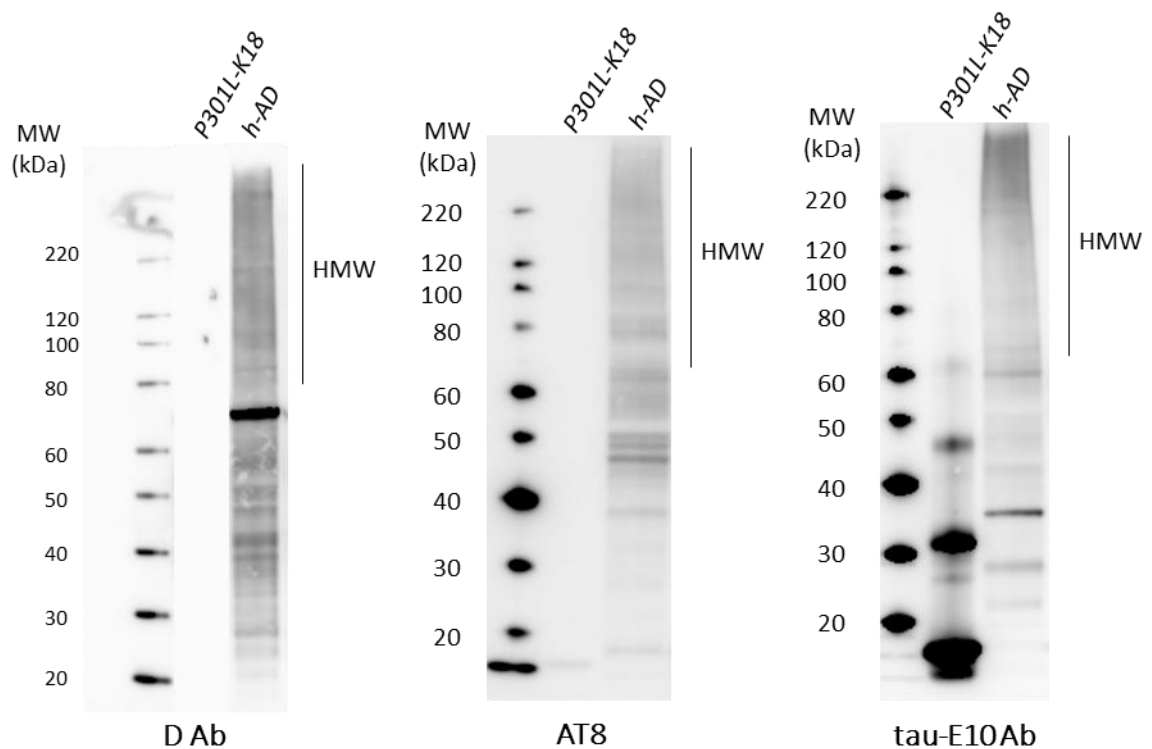
### *I. Les fibrilles P301L-K18 sont en mesure d'induire le recrutement et la nucléation de protéines tau humaines mutées, exprimées dans le cerveau de jeunes souris htauP301L*

En vue de déterminer la capacité de l'anticorps D à bloquer la propagation d'espèces extracellulaires et pathologiques de tau, des fibrilles P301L-K18 recombinantes, non reconnues par l'anticorps D (Fig. 11), ont été injectées dans l'hippocampe droit de souris transgéniques htauP301L âgées de 4 mois. Six semaines et 24h post-injection, les formes hyperphosphorylées de tau ont été révélées puis quantifiées par un immunomarquage AT8 au sein des hippocampes (Fig. 10).



**Figure 10 : Les fibrilles P301L-K18 recombinantes sont en mesure de recruter et induire la nucléation des protéines tau humaines mutées exprimées dans les souris htauP301L.** Des fibrilles P301L-K18 (1 $\mu$ l, 5  $\mu$ g/ $\mu$ l) (A) ou du PBS (5  $\mu$ l) (B) ont été injectés dans l'hippocampe droit de souris htauP301L âgée de 4 mois. Six semaines post-injection, les animaux ont été sacrifiés et la présence d'espèces hyperphosphorylées de tau a été révélée par immunofluorescence au départ de l'anticorps AT8. L'immunoréactivité AT8 détectée au bregma d'injection est illustrée (A, B). Pourcentage de surface AT8 positive dans les hippocampes ipsi- et contralatéral. (C, souris hP301L Tg injectées avec P301L-K18 ou PBS: hippocampe ipsilatéral p=0.0032 et contralatéral p=0.0029) Les pourcentages d'immunoréactivité ont été quantifiés au départ de 20 coupes de cerveau (Bregma -2.06 à -3,64). Les données sont présentées sous forme de « moyenne  $\pm$  SEM » et analysées par des U tests de Mann Whitney (n=15 hP301L Tg mice+P301L-K18, n=4 hP301L Tg mice+PBS). \*\* p < 0.01).

En regard des souris ayant reçu l'injection intracérébrale de PBS (Fig. 10.B), les souris injectées avec des fibrilles P301L-K18 (Fig. 10.A) présentent une immunoréactivité AT8 significativement plus élevée, dans les hippocampes ipsi- et contralatéral. (Fig. 10.C). Cette augmentation d'immunoréactivité au regard des souris contrôles est plus importante dans l'hippocampe ipsilatéral ayant reçu l'injection de fibres K18-P301L (Fig. 10.C, 67 fois) en comparaison à l'hippocampe contralatéral (Fig. 10.C, 23.5 fois). Dans ce modèle, l'injection de matériel fibrillaire dans des souris non-transgéniques n'a pas été nécessaire. En effet, l'immunoréactivité AT8 observée ne peut pas être le résultat de l'internalisation des fibrilles P301L-K18 injectées, car l'épitope de l'anticorps AT8 (pSer202, pThr205, pSer208) est localisé à l'extérieur des domaines de répétitions constituant le peptide K18 (Fig. 5.A). De ce fait, le marquage AT8 observé suite à l'injection des fibrilles P301L-K18 est indiscutablement le résultat d'un recrutement et nucléation des protéines tau P301L humaines endogènes initié au départ des amorces fibrillaires injectées. La figure 11 reprend les contrôles biochimiques internes effectués pour confirmer l'absence de reconnaissance des fibres K18-P301L par l'anticorps D et l'anticorps AT8.



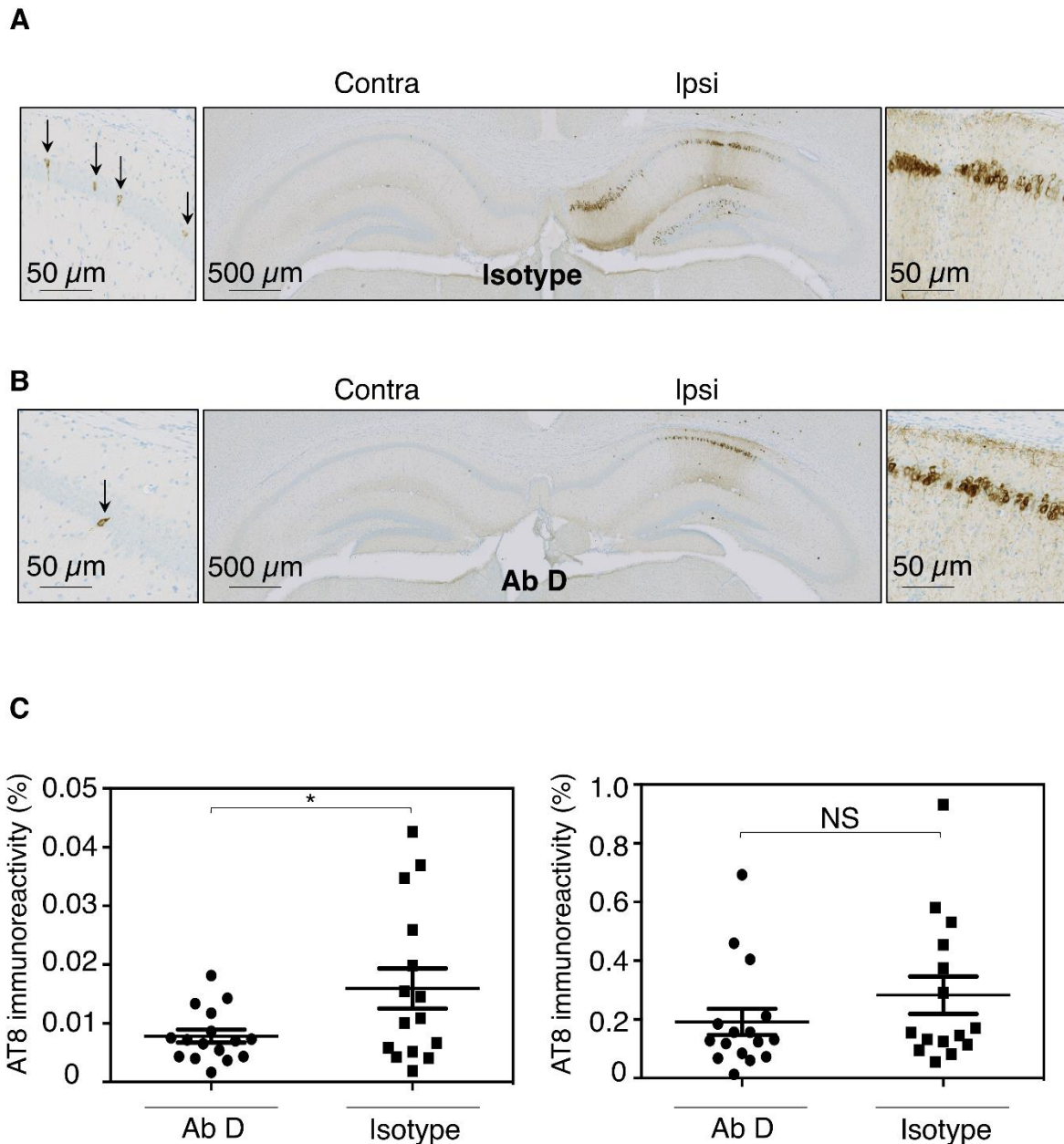
**Figure 11 : Non-reconnaissance des fibres K18-P301L par les anticorps D et AT8.** 15µg d'homogénats de cerveau Alzheimer (h-AD) et 2.5 µg de fibrilles K18-P301L recombinantes ont été déposés sur gel d'acrylamide et révélés en utilisant les anticorps D, AT8 et un anticorps anti-exon10 (tau-E10 ; anticorps en mesure de reconnaître les fibres).

## *II. L'immunisation passive utilisant l'anticorps D est en mesure de prévenir la propagation d'espèces pathologiques composées de protéines tau humaines*

Dans le point précédent, le modèle P301L-K18 est présenté comme un modèle classique de recrutement/nucléation de protéines tau humaines mutées suite à l'injection d'amorces fibrillaires. Dans ce point, il sera montré en quoi ce modèle P301L-K18, peut également être utilisé comme modèle de propagation des tauopathies.

Étant donné que seul l'hippocampe ipsilatéral a reçu l'injection de fibrilles P301L-K18 et que les tests de diffusion au blue Evans à ces coordonnées d'injection montrent une absence de diffusion dans l'hippocampe contralatéral (Fig. 2.B), on peut déduire que l'immunoréactivité AT8 détectée dans l'hémisphère non-injecté, est le résultat d'une propagation de formes sécrétées pathologiques en provenance de la tauopathie induite dans l'hippocampe ipsilatéral. Comme montré ci-dessus (Fig. 11), de par son épitope en dehors des domaines de répétition du peptide K18, l'anticorps D est incapable de reconnaître et prévenir l'internalisation des fibrilles injectées. Par conséquent, l'anticorps D ne pourra potentiellement agir que sur la propagation des espèces sécrétées pathologiques composées de protéines tau P301L humaines.

Le modèle K18-P301L a donc été utilisé en vue de tester l'effet d'une immunothérapie passive au départ de l'anticorps D sur la propagation, dans l'hippocampe contralatéral, d'espèces humaines sécrétées de tau. Le protocole d'immunisation propre à ce modèle, a été décrit dans le matériel et méthodes (Fig. 1.B). Il consiste en des injections intrapéritonéales répétées d'anticorps D ou de l'anticorps témoin isotype avant et après injection intracérébrale de fibrilles K18-P301L. Six semaines post-injection, l'ampleur des tauopathies en présence des traitements immunothérapeutiques a été évaluée par immunohistochimie au départ de l'anticorps AT8 (Fig. 12).



**Figure 12 : L'immunisation passive utilisant l'anticorps D s'oppose à la propagation d'espèces humaines sécrétées pathologiques.** Des souris htauP301L âgées de 4 mois ont reçu des injections répétées (IP à 30mg/kg) d'anticorps D (D Ab) (B, C) ou d'un témoin isotype (Isotype) (A, C), 24h avant l'injection stéréotaxique de fibrilles K18-P301L dans l'hippocampe droit. Les anticorps ont ensuite été administrés par voie IP de manière hebdomadaire pendant 6 semaines. Les souris ont été sacrifiées 24h après la dernière injection IP et les formes hyperphosphorylées de tau présentes au sein du cerveau ont été quantifiées à l'aide d'immunohistochimies au départ de l'anticorps AT8. L'immunoréactivité AT8 détectée au bregma d'injection est illustrée (A, B). Pourcentage de surface AT8 positive dans les hippocampes ipsi- et contralatéral. (C, souris htauP301L injectées avec P301L-K18, traitées avec Ab D ou PBS : hippocampe ipsilatéral  $p=0.109$  et contralatéral  $p=0.0282$ ). Les pourcentages d'immunoréactivité ont été quantifiés au départ de 20 coupes de cerveau (Bregma -2.06 à -3,64). Les données sont présentées sous forme de « moyenne  $\pm$  SEM » et analysées par des tests U de Mann et Whitney ( $n=16$  hP301L Tg mice+P301L-K18+Ab D,  $n=15$  hP301L Tg mice+P301L-K18+isotype). \* $p < 0.05$ .



Comme attendu, une immunoréactivité AT8 a été détectée en présence de l'anticorps témoin (isotype Ab) dans les hippocampes ipsi- et controlatéral (Fig. 12.A). L'immunothérapie passive utilisant l'anticorps D n'a pas été en mesure de réduire significativement l'apparition des formes hyperphosphorylées de tau dans l'hippocampe ipsilatéral (Fig. 12.C,  $p = 0.1009$ ). Cette absence de réduction de l'immunoréactivité AT8 dans l'hippocampe ipsilatéral n'est pas surprenante du fait de l'incapacité de l'anticorps D à reconnaître et prévenir l'internalisation des fibrilles P301L-K18 injectées dans cet hémisphère. Une observation beaucoup plus intéressante et informative, est la diminution significative de l'immunoréactivité AT8 dans l'hippocampe controlatéral après des injections IP répétées de l'anticorps D (Fig. 12.C, B,  $p = 0,00282$ ). En effet, cette réduction des formes hyperphosphorylées de tau dans l'hippocampe controlatéral, traduit la capacité de l'anticorps D à empêcher la propagation de protéines tau humaines sécrétées par les neurones de l'hippocampe ipsilatéral, responsables de la propagation et apparition de la tauopathie AT8 positive au sein de l'hippocampe contralatéral.

Ensemble, ces résultats attestent que l'anticorps D, dirigé contre la région médiane de la protéine tau (acides aminés 235-250), est très efficace en vue de prévenir, au sein des tauopathies, les phénomènes de recrutement et nucléation mais également de propagation.

# Discussion

Au vu de la propagation spatio-temporelle de certaines tauopathies au sein de régions cérébrales neuroconnectées (Braak and Braak, 1991; Delacourte et al., 1999; Duyckaerts et al., 1997) et aux nombreuses études démontrant un transfert intercellulaire de formes pathologiques de la protéine tau de type-prion (Frost, Jacks, and Diamond 2009; Kfoury et al. 2012; Ahmed et al. 2014), beaucoup d'attention et d'espoir ont été placés en l'immunothérapie dirigée contre la protéine tau, afin de bloquer la progression et l'évolution symptomatique des tauopathies.

De nombreuses études précliniques ont montré des effets très prometteurs d'immunothérapies actives (Asuni et al. 2007a; A. Boutajangout, Quartermain, and Sigurdsson 2010; Boimel et al. 2010; Bi et al. 2011; Kontsekova, Zilka, Kovacech, Novak, et al. 2014a) et passives (Chai et al. 2011; Allal Boutajangout et al. 2011; Yanamandra et al. 2013b; Collin et al. 2014; Gu, Congdon, and Sigurdsson 2013) dirigées contre la protéine tau au sein de modèles transgéniques murins de tauopathies. Plusieurs de ces études rapportent des fonctions cognitives et motrices plus performantes, en regard de réductions significatives des espèces pathologiques de la protéine tau chez les souris traitées.

A ce jour, un très grand nombre d'épitopes répartis sur l'ensemble des domaines de la protéine tau, ont été la cible de traitements immunothérapeutiques passifs, et sont associés à une baisse significative de la pathologie tau (Congdon and Sigurdsson 2018; Sigurdsson 2016). Il serait intéressant, au départ de ces études, de définir les épitopes les plus prometteurs en vue d'empêcher la progression et propagation des tauopathies. Seulement, de par leur provenance diverse et leur hétérogénéité, il est difficile de comparer les travaux publiés entre eux. En plus de cibler des épitopes distincts, il faut prendre en compte que les traitements immunothérapeutiques se distinguent de par leurs protocoles d'immunisation (voie d'administration, concentrations, espacement entre les injections, durée du traitement), l'isotype et l'affinité de l'anticorps, le modèle transgénique utilisé...

Ce manque d'informations concernant les épitopes les plus enclins à prévenir l'évolution des tauopathies, explique la diversité des régions de la protéine tau ciblées au sein des immunothérapies actuellement en essais cliniques de phase II. En immunothérapie passive, les anticorps testés sont Abbv-8E12 (acides aminés 25-30), BIIB092 (acides aminés 15-24), LY3303560 (épitope conformationnel MC1) et RO7105705 (pSer409). Concernant l'immunothérapie active, à ce jour, seul le vaccin AADvac1 (acides aminés 293-305) est en essai clinique de phase II.

Dans le but de déterminer les épitopes les plus prometteurs en vue de neutraliser les espèces pathologiques de tau, l'entreprise pharmaceutique UCB Biopharma a réalisé, en 2018, une immunisation à très large échelle dirigée contre la protéine tau chez des souris, au départ de PHFs purifiés à partir d'extraits de cerveaux de patients Alzheimer, de monomères de protéine tau, de fibres recombinantes ou de peptides porteurs d'épitopes pathologiques (Courade et al. 2018). En regard de ces immunisations, les propriétés de liaison d'une centaine d'anticorps ont été définies par résonance plasmonique de surface. Ensuite, la capacité potentielle à prévenir l'agrégation de tau a été évaluée *in vitro*, pour la moitié de ces anticorps dans un modèle d'agrégation intracellulaire, basé sur le recrutement et la nucléation de protéines tau induites par des PHFs purifiés à partir d'extraits de cerveaux de patients atteints d'Alzheimer (> 100 patients AD). Parmi cinq candidats en mesure de prévenir entièrement l'agrégation, l'anticorps D, ciblant un épitope central sur la protéine tau (acides aminés 235 à 250) s'est distingué, de par sa plus grande efficacité. L'entreprise UCB Biopharma a alors décidé de tester les propriétés de ce nouvel anticorps D en regard de 4 anticorps anti-tau décrits dans la littérature, ciblant les acides aminés 15 à 24 (Ac A) (Bright et al. 2015), 25 à 30 (Ac B) (Yanamandra et al. 2015), pSer422 (Ac E) (Collin et al. 2014) et les résidus 7 à 9 / 312 à 322 (épitope conformationnel de l'anticorps MC1 ; Ac F) (Chai et al. 2011; d'Abramo et al. 2013). Les anticorps A, B, E et F ont été produits au départ des séquences variables décrites dans leur brevet et présentent un isotype IgG $\gamma$ 1. *In vitro*, dans des conditions expérimentales identiques, seul l'anticorps D a été en mesure d'inhiber entièrement l'agrégation intracellulaire induite par les PHFs. Ces résultats étant obtenus au départ d'anticorps anti-tau de même isotype (IgG1) démontrent l'importance capitale du choix de l'épitope pour développer un traitement immunothérapeutique optimal. Dans ce modèle, l'anticorps D a également été capable de prévenir entièrement l'agrégation intercellulaire induite par des amorces fibrillaires humaines purifiées au départ de cerveaux de patients atteints de PSP ou de FTD. Dernièrement, l'entreprise Janssen a également comparé *in vitro* et *in vivo* l'efficacité de plusieurs anticorps dirigés contre la protéine tau et a également mis en évidence le haut potentiel d'un anticorps ciblant la région centrale de la protéine (acides aminés 249-258) (Vandermeeren et al. 2018).

En raison de l'intérêt soulevé par la capacité de l'anticorps D à prévenir entièrement l'agrégation intracellulaire induite par des PHFs humains purifiés au départ de différentes tauopathies (AD, PSP et FTD), l'objectif de ce projet de thèse a été de confirmer les propriétés de l'anticorps D *in vivo*. Parmi les anticorps auxquels ont été comparés l'Ab D *in vitro* (Courade et al. 2018), l'anticorps A, ciblant l'extrémité N-terminale de la protéine tau (acides aminés 15 à 24), est l'anticorps dont l'affinité, bien que supérieure, s'approche le plus à celle de l'anticorps D à la fois pour les monomères et les PHFs purifiés à partir d'extraits de cerveaux de patients atteints d'Alzheimer. Pourtant, dans le modèle cellulaire, l'anticorps A n'a pas été en mesure de prévenir l'agrégation intracellulaire induite par l'ajout

de PHFs. Afin de confirmer cette différence d'efficacité épitope-dépendante et, par la même occasion, juger de la pertinence des résultats obtenus *in vitro* dans le modèle d'agrégation, l'efficacité de traitements immunothérapeutiques utilisant l'anticorps A a également été évaluée dans notre étude.

En regard du manque de connaissances concernant les espèces impliquées dans la propagation et le profil de phosphorylation des protéines tau pouvant varier d'une tauopathie, voire d'un individu à l'autre, l'utilisation d'anticorps ciblant la protéine tau totale, reconnaissant à la fois les formes monomériques et fibrillaires de tau, permettra peut-être, de par une plus large fenêtre d'action, de démontrer des effets bénéfiques plus importants lors d'éventuels essais cliniques. Toutefois, ces traitements ciblant également la forme sauvage de la protéine tau, il convient de s'assurer de l'absence d'effets secondaires, en regard d'une atteinte potentielle de la fonction physiologique de la protéine.

## I. Modèle de nucléation

Désirant travailler sur du **matériel humain**, nous avons, dans un premier temps, créé un modèle murin permettant de confirmer les capacités potentielles des anticorps A et D à neutraliser les amorces pathologiques présentes au sein d'un extrait de cerveau issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. En vue de cibler des **espèces extracellulaires** pathologiques de tau, le modèle développé consiste en l'injection intracérébrale d'un homogénat de cerveau Alzheimer dans la région CA1 droite de l'hippocampe de jeunes souris transgéniques (Tg30tau). Cinq semaines post-injection, les amorces 'Alzheimer' ont conduit à l'apparition significative de formes hyperphosphorylées et agrégées de la protéine tau par recrutement et nucléation des protéines tau humaines mutées endogènes de la lignée transgénique. Dans la mise au point de ce modèle, il a été mis en évidence que l'injection d'homogénat de cerveau Alzheimer, en regard de l'injection d'une solution enrichie en PHFs purifiés à partir d'extraits de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, semblait plus efficace pour induire une potentialisation de la tauopathie. De ce fait, la nature des amorces extracellulaires semble importante et associée à des capacités de recrutement et nucléation diverses. Soulignons que pour conclure avec certitude sur le pouvoir agrégatif supérieur de l'homogénat de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer en regard de PHFs purifiés à partir d'extraits de cerveaux Alzheimer, la concentration en protéines tau au sein des différents extraits aurait dû être déterminée et ajustée en amont de l'expérience.

L'injection intracérébrale d'homogénat de cerveau issu d'un patient souffrant d'Alzheimer a été réalisée sur des souris Tg30tau âgées de 1 mois, à un stade où la pathologie intrinsèque propre au modèle transgénique n'est pas encore détectée. En conséquence, le développement de la tauopathie au sein de ce modèle est directement lié à l'injection de l'extrait. Pour définir si les formes

pathologiques observées dans ce modèle sont le résultat d'un phénomène de nucléation ou d'une capture du matériel injecté, des souris non-transgéniques (issues de mêmes portées) ont été injectées avec le même homogénat. L'absence d'immunomarquage au sein de ces souris contrôles démontre que la tauopathie observée au sein de notre modèle est le résultat d'un recrutement et d'une nucléation des protéines tau humaines mutées intracellulaires en réponse à l'injection intracérébrale d'amorces présentes dans l'homogénat de cerveau du patient atteint d'Alzheimer.

Dans ce modèle de nucléation, le traitement immunothérapeutique au départ de l'anticorps A ne semble pas affecter le développement de la tauopathie. À l'opposé, des injections intrapéritonéales répétées d'anticorps D sont associées à une réduction hautement significative des formes hyperphosphorylées (AT8) et agrégées (AT100) de la protéine tau (Allen et al. 2002; Augustinack et al. 2002). Ces résultats, obtenus sur base de quantifications immunohistochimiques, ont été confirmés par des approches biochimiques où seul l'anticorps D permet de réduire significativement la quantité de protéines tau présentes dans la fraction insoluble au sarkosyl.

Ces résultats *in vivo* confirment parfaitement les données *in vitro* obtenues par l'entreprise UCB BioPharma montrant la capacité de l'anticorps D à neutraliser les espèces présentes dans un extrait de cerveaux issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et l'absence de neutralisation de ces même espèces, en présence de l'anticorps A (Courade et al. 2018).

Comme nous l'avons montré, la nature des amorces injectées (exemple : PHFs versus homogénat) pourrait être déterminante pour le développement de la tauopathie résultante. Dans ce modèle, nous avons utilisé un extrait préparé au départ d'un seul échantillon de cerveau issu d'un patient atteint d'Alzheimer. Il est donc possible qu'un homogénat issu du cerveau d'un autre patient, contenant un profil d'amorces distinct, répondrait différemment aux deux traitements immunothérapeutiques. C'est pourquoi, en vue de confirmer ces effets associés aux anticorps A et D, une étude *in vivo* similaire est en cours au départ d'un second homogénat de cerveau provenant d'un autre patient atteint d'Alzheimer. Il est important de souligner que dans le modèle d'agrégation *in vitro*, les PHFs utilisés pour induire l'agrégation intracellulaire, ont été préparés au départ d'échantillons de cerveaux issus de plus de 100 patients atteints de la maladie Alzheimer (Courade et al. 2018). Pour rappel, dans ce modèle, l'anticorps D a été en mesure de prévenir entièrement l'agrégation, ce qui sous-entend une capacité à neutraliser les amorces pathologiques présentes chez l'ensemble de ces patients.

Dans ce modèle de nucléation, la quantification immunohistochimique des espèces pathologiques de la protéine tau, en réponse au traitement immunothérapeutique avec l'anticorps D, montre une diminution significative de la tauopathie dans la région CA1 ipsilatérale mais également dans la région contralatérale. Cette région pouvant être considérée comme un site potentiel de projection et/ou de

propagation, nous nous sommes interrogés quant à la capacité de l'anticorps D à bloquer la propagation intercellulaire d'espèces pathologiques de tau. Toutefois, il semble difficile de répondre à cette question au départ de ce modèle de nucléation. En effet, en raison des coordonnées d'injection stéréotaxiques très médianes, il nous est impossible d'exclure l'hypothèse d'une diffusion de l'homogénat dans l'hémisphère controlatéral. De plus, même en supposant une absence de diffusion des amorces, la diminution de propagation de la tauopathie dans la région CA1 contralatérale pourrait être une simple conséquence de la diminution drastique de la tauopathie au site d'injection en présence de l'anticorps D.

## **II. Modèle de propagation**

La propagation intercellulaire d'espèces pathologiques de tau semblant être à l'origine de la progression intracérébrale des tauopathies (Ahmed et al. 2014; Iba et al. 2013; Stancu et al. 2015; Narasimhan et al. 2017), nous avons décidé d'utiliser un second modèle, basé sur l'injection intracérébrale de fibrilles recombinantes K18-P301L, afin d'étudier spécifiquement la capacité de l'anticorps D à prévenir *in vivo* la propagation d'espèces humaines pathologiques de tau (Peeraer et al. 2015).

*En quoi ce modèle de propagation basé sur l'injection de fibrilles recombinantes est tout aussi indispensable et pertinent en vue d'évaluer le caractère prometteur d'un anticorps à visée thérapeutique ?*

Dans le modèle de nucléation, le matériel injecté est d'origine humaine ce qui semble être un avantage considérable afin d'appréhender les effets thérapeutiques chez l'homme. Cependant, même si ce modèle a permis de démontrer que l'anticorps D est en mesure d'empêcher l'internalisation ou de neutraliser les amorces pathologiques contenues dans l'homogénat de cerveau de patient atteint d'Alzheimer, il est compliqué d'être certain que cet anticorps aura un effet similaire au contact des réelles amorces extracellulaires pathologiques présentes chez le patient. En effet, les amorces contenues dans l'homogénat sont principalement de provenance intracellulaire et la question se pose de savoir si elles sont vraiment représentatives des espèces extracellulaires à l'origine de la propagation.

Bien que les formes toxiques impliquées dans la propagation de la tauopathie n'ont pas été clairement définies, plusieurs articles ont montré que la protéine tau sécrétée abordait un profil de phosphorylation réduit en regard des formes hyperphosphorylées présentes en intracellulaire (Polanco et al. 2016; Y. Wang et al. 2017). L'utilisation d'extraits de cerveaux de patients atteints d'Alzheimer pourrait, de ce fait, surestimer l'effet bénéfique potentiel d'anticorps phospho-

dépendants. Le risque de modifications des espèces toxiques propagatives de tau en regard du délai post mortem est également à prendre en considération.

D'autres études révèlent la présence de formes tronquées distinctes, entre les protéines tau intra- et extracellulaires (Barthélemy, Fenaille, et al. 2016; Barthélemy, Gabelle, et al. 2016; Sato et al. 2018). Par exemple, des épitopes retrouvés sur les protéines tau intracellulaires semblent absents des formes tronquées détectées au sein du LCR ou sécrétées par des neurones humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. Cela implique qu'un anticorps, capable de prévenir l'internalisation ou neutraliser les amorces purifiées au départ de cerveaux de patients atteints d'Alzheimer, pourrait cibler un épitope non-présent sur les formes extracellulaires propagatives retrouvées dans le liquide interstitiel (ISF). Malheureusement, l'ISF étant très difficile d'accès, le profil des formes tronquées de tau qui s'y trouvent, n'est actuellement pas disponible.

Enfin, il faut garder à l'esprit que bien que la protéine tau extracellulaire soit principalement retrouvée sous forme libre, plusieurs travaux suggèrent une implication des vésicules extracellulaires dans la propagation de la pathologie tau (Dujardin, Bégard, et al. 2014; Polanco et al. 2016; Y. Wang et al. 2017; Asai et al. 2015). Selon ces travaux (Y. Wang et al. 2017; Dujardin, Bégard, et al. 2014), la protéine tau serait localisée à l'intérieur des vésicules, ce qui serait peu propice à une reconnaissance par des approches immunothérapeutiques dirigées contre la protéine. Ce mécanisme de transfert potentiel médié par des vésicules extracellulaires n'est visiblement pas pris en compte dans le modèle de nucléation, basés sur l'injection d'amorces exclusivement intracellulaires.

La précision de ces quelques limites concernant l'utilisation d'extraits de cerveaux humains n'a pas pour but de discréditer ces modèles mais de mettre en lumière l'importance et la nécessité de tester en parallèle, dans d'autres modèles, la capacité des traitements immunothérapeutiques à prévenir la **propagation** intercellulaire d'espèces extracellulaires de tau. L'interprétation de l'effet des traitements immunothérapeutiques au sein des modèles de nucléation et de propagation permettront de prédire avec plus de certitudes des effets bénéfiques potentiels des traitements immunothérapeutiques chez l'homme.

Le modèle de propagation que nous avons développé s'inspire des travaux de Peeraer et collaborateurs (Peeraer et al. 2015). Il consiste en l'injection de fibrilles recombinantes P301L-K18 dans l'hippocampe droit de jeunes souris transgéniques htauP301L (Terwel et al. 2005). Dans ce modèle, les coordonnées d'injection ont été définies en un site plus latéral permettant d'exclure un risque de diffusion du matériel injecté vers l'hémisphère contralatéral.

Ce modèle a l'avantage d'être un des rares modèles *in vivo* permettant d'étudier avec certitude un phénomène de propagation. La critique que l'on peut émettre concerne le niveau d'homologie entre

les espèces sécrétées chez l'homme et celles sécrétées dans ce modèle, basé sur l'injection intracérébrale d'amorces recombinantes dans l'hippocampe de souris transgéniques. En effet, l'utilisation d'animaux transgéniques est critiquable dans nos deux modèles, car elle implique la surexpression de protéines tau humaines mutées, or la plupart des tauopathies n'impliquent pas de mutations de la protéine tau.

Tout comme l'homogénat de cerveau issu d'un patient atteint d'Alzheimer, l'injection des fibrilles K18-P301L est associée à l'apparition significative de formes hyperphosphorylées de la protéine tau dans les hippocampes ipsi- et contralatéral. L'épitope de l'anticorps AT8 utilisé pour visualiser les protéines tau hyperphosphorylées se situant en dehors du peptide K18, le marquage observé est sans conteste le résultat d'un recrutement et nucléation des protéines tau humaines endogènes.

L'anticorps D, possédant également un épitope situé en dehors du peptide K18, n'est pas en mesure de lier et de prévenir l'internalisation des fibrilles injectées. Ce dernier ne peut, par conséquent, potentiellement agir que sur des formes sécrétées humaines pathologiques. Dans ce modèle, en accord avec son incapacité à prévenir l'internalisation des fibrilles K18-P301L, l'anticorps D n'a pas été en mesure de prévenir l'apparition des espèces hyperphosphorylées de la protéine tau dans l'hippocampe ipsilatéral. De manière intéressante, il est observé que le traitement immunothérapeutique utilisant l'anticorps D permet de réduire significativement l'apparition de la tauopathie dans l'hippocampe contralatéral. Ceci implique que l'anticorps D est en mesure de bloquer le transfert intercellulaire de formes humaines sécrétées et pathologiques, responsables de la propagation de la pathologie tau dans l'hémisphère contralatéral.

Grâce à l'utilisation combinée de ces deux modèles, nous avons démontré que l'anticorps D était capable de s'opposer à la propagation intercellulaire de la tauopathie *in vivo* et en mesure de neutraliser les espèces pathologiques présentes dans un extrait de cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer.

### **III. Mécanisme d'action de l'anticorps D**

Ces résultats associés aux traitements immunothérapeutiques utilisant l'anticorps D étant très prometteurs, il est intéressant d'étudier le mécanisme d'action sous-jacent.

Comme expliqué dans l'introduction, selon leur isotype, les anticorps vont reconnaître avec plus ou moins d'affinité, les différents récepteurs Fc (Jönsson and Daëron 2012). Il en découle des mécanismes d'action distincts et en partie prédictibles. Sur base de leur affinité préférentielle pour les récepteurs



FcγRIIB, associés à l'émission de signaux inhibiteurs, les anticorps murins d'isotype IgG1 ne devraient pas être associés à une internalisation et clairance microgliale.

Sigurdsson et ses collaborateurs, ayant étudiés le mécanisme d'action d'anticorps anti-tau d'isotype IgG1, notent une absence d'impact d'inhibiteurs de la phagocytose sur l'internalisation des anticorps, ce qui tend à confirmer l'absence d'implication de la microglie. Leur anticorps seraient associés à deux mécanismes d'action complémentaires. Dans un premier temps, l'anticorps agit en fixant et bloquant l'internalisation d'espèces pathologiques de tau présentes dans le milieu extracellulaire. Ensuite, un mécanisme de clairance intracellulaire est également décrit. Il consiste en une internalisation neuronale par pinocytose (endocytose clathrine-dépendante), médiée par les récepteurs FcγII/III et aboutissant à une dégradation lysosomale ou quelques fois autophagique (Gu, Congdon, and Sigurdsson 2013; Congdon et al. 2016).

D'autres équipes ont également mis en évidence l'internalisation neuronale d'anticorps d'isotype IgG1 et semblent s'accorder sur l'importance de la présence intracellulaire de l'antigène pour observer une internalisation (Allal Boutajangout et al. 2011; Gu, Congdon, and Sigurdsson 2013; Collin et al. 2014).

En vue de définir l'implication relative de ces mécanismes d'action intra et extracellulaire, Congdon et collaborateurs ont étudié la localisation de l'anticorps sous différentes conditions (Congdon et al. 2016). Dans leur modèle, ils démontrent une internalisation cellulaire de l'anticorps IgG1 au contact de cellules préalablement incubées en présence de PHFs purifiés à partir d'extraits de cerveaux issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. À l'opposé, aucune internalisation n'est observée quand l'anticorps est incubé seul, ou complexé à des PHFs, avant d'être mis au contact de cellules naïves dépourvues d'antigènes (Shamir et al. 2016).

Sur base de ces travaux réalisés au départ d'anticorps anti-tau d'isotype IgG1, il semble que lorsque les anticorps rencontrent leur antigène dans le milieu extracellulaire, ils fixent la protéine tau et préviennent son internalisation, ce qui suggère un mécanisme de clairance extracellulaire. Si les anticorps ne rencontrent pas leur cible en extracellulaire, ils semblent internalisés dans les neurones accumulant des protéines tau pathologiques et associés à une action intracellulaire.

Sur base de ces hypothèses, dans le modèle de nucléation, l'anticorps D se lierait en extracellulaire aux amorces pathologiques contenues dans l'homogénat de cerveau issu d'un patient atteint d'Alzheimer et préviendrait ainsi leur internalisation, ce qui limiterait l'apparition de la tauopathie. Concernant le modèle de propagation, suite à l'internalisation des fibrilles K18-P301L, un recrutement et nucléation des protéines tau humaines mutées intracellulaires aboutirait à la sécrétion de formes humaines pathologiques propagatives qui seraient reconnues et neutralisées dans le milieu extracellulaire par l'anticorps D. Bien que l'anticorps D ne permette pas de réduire significativement le développement

de la tauopathie dans l'hippocampe injecté, une légère baisse du pourcentage d'immunoréactivité y est observée. Cette légère diminution pourrait provenir d'une petite action intracellulaire de l'anticorps D, en réponse à l'accumulation progressive d'espèces pathologiques de tau suite à l'internalisation des fibres K18.

L'anticorps D étant capable de prévenir entièrement l'agrégation héparine-dépendante de la protéine tau *in vitro*, on peut penser qu'un mécanisme similaire pourrait survenir en intracellulaire en s'opposant au recrutement et à la nucléation des protéines tau endogènes. Cette action potentielle en intracellulaire de l'anticorps D n'est actuellement qu'une hypothèse et l'absence de différence significative dans l'hippocampe injecté avec les fibrilles K18-P301L en présence de l'Ab D, laisse penser à un mécanisme d'action principalement extracellulaire.

Afin d'avoir plus d'informations sur la localisation et le mécanisme d'action de l'anticorps D, nous avons injecté ce dernier dans l'hippocampe de jeunes souris Tg30tau : seul, pré-incubé avec de l'homogénat de cerveau issu d'un patient atteint d'Alzheimer ou pré-incubé avec de la lipofectamine pour forcer son internalisation. Deux semaines avant ces injections intracérébrales d'anticorps, les souris Tg30tau ont été injectées en intracérébral avec de l'homogénat de cerveau Alzheimer pour s'assurer de la présence de neurones en dégénérescence neurofibrillaire au moment de l'injection des anticorps. Cette pré-injection a pour but d'étudier la possibilité d'une éventuelle internalisation « dirigée » de l'anticorps D dans les neurones accumulant des espèces pathologiques de tau comme le suggère plusieurs études (Allal Boutajangout et al. 2011; Congdon et al. 2016; Collin et al. 2014).

#### **IV. Espèces toxiques de tau responsables de la propagation :**

Au cours de ce projet de thèse, l'anticorps D, ciblant un épitope central de la protéine tau, s'est vu en mesure de neutraliser les espèces toxiques contenues dans un extrait de cerveau issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer et de prévenir significativement le phénomène de nucléation associé à l'injection intracérébrale de ces amorces. A l'opposé, l'anticorps A, ciblant un épitope N-terminal, n'a démontré aucun effet bénéfique dans ce modèle. Ces résultats tendent à confirmer l'importance capitale du choix de l'épitope ciblé sur la protéine tau dans la recherche de traitements immunothérapeutiques visant à prévenir la progression des tauopathies.

Au vu des propriétés bénéfiques de l'anticorps D dans le modèle de nucléation, nous avons testé les effets de cet anticorps dans un second modèle murin de tauopathie qui nous a permis de démontrer qu'il était également en mesure de bloquer *in vivo*, la propagation d'espèces sécrétées pathologiques de tau. Ce second modèle a ainsi confirmé le caractère hautement prometteur de l'anticorps D en vue de prévenir la propagation intracérébrale des tauopathies.

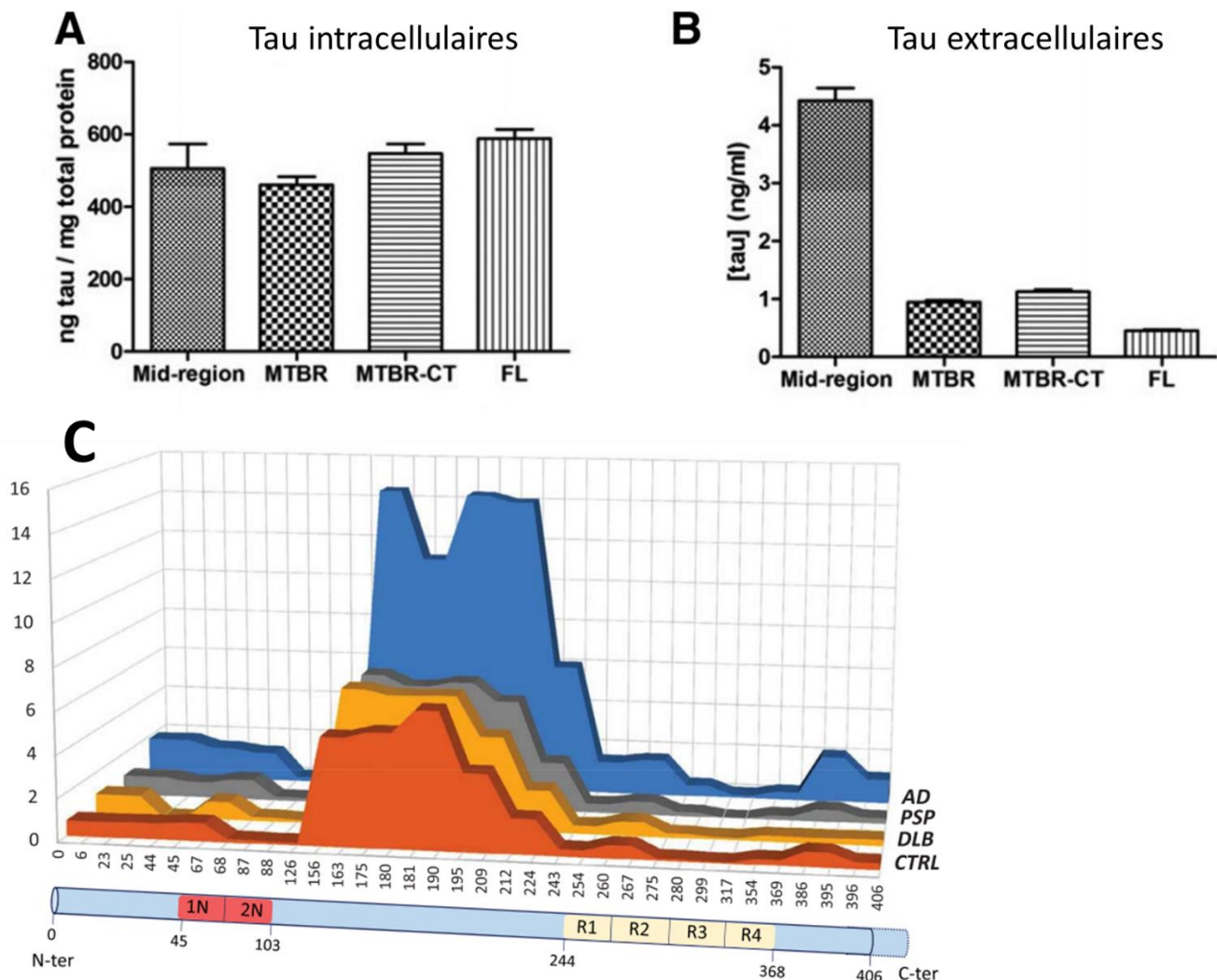
Au vu de ces résultats précliniques, l'entreprise UCB Pharma est entrée, en 2018, en essai clinique de phase 1 avec l'anticorps humanisé UCB0107, ciblant un épitope identique à celui de l'anticorps D. La phase 1 ayant été validée, un essai clinique de phase 2 débutera en 2019 chez des patients atteints de PSP.

Compte tenu du fait que nous n'avons testé qu'un seul anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine tau dans notre modèle de nucléation, il serait prématuré de conclure sur une potentielle inefficacité de l'ensemble des anticorps ciblant cette région de la protéine. Cependant, une différence d'efficacité aussi marquée entre les deux anticorps testés suggère la reconnaissance d'espèces de tau distinctes selon l'épitope ciblé sur la protéine. Les formes de la protéine tau responsables de la propagation intracérébrale de la pathologie tau n'ont, à ce jour, pas été clairement identifiées. Dans la littérature, il est montré que sous forme monomérique (Mirbaha et al. 2018a), oligomérique (C. A. Lasagna-Reeves et al. 2012) ou fibrillaire (J. L. Guo and Lee 2011; Santa-Maria et al. 2012), les espèces pathologiques de la protéine tau possèdent des fonctions d'agents de nucléation.

Sur base des résultats générés et de la littérature, l'efficacité de l'anticorps D semble associée à un mécanisme d'action exclusivement extracellulaire (Congdon et al. 2016), ce qui implique la participation d'espèces extracellulaires libres de tau dans la propagation des tauopathies. Quelles sont les données à ce jour disponibles concernant les protéines tau présentes dans le milieu extracellulaire ? Le liquide interstitiel (ISF) étant difficile d'accès, les seules informations dont nous disposons concernant les espèces extracellulaires de tau, reposent sur des études *in vitro* (Kanmert et al. 2015; Sato et al. 2018) ou sur l'analyse par spectrométrie de masse du LCR humain (Barthélemy, Gabelle, et al. 2016; Barthélemy, Fenaille, et al. 2016; Sato et al. 2018).

Selon les études *in vitro* de Kanmert, contrairement aux protéines tau intracellulaires majoritairement entières (Fig. 13.A), les protéines tau sécrétées par des neurones primaires semblent systématiquement clivées en leur extrémité C-terminale et n'incluent pas le domaine de liaison aux microtubules (MTBR) (Fig. 13.B) (Kanmert et al. 2015).

De la même manière, les travaux de Barthélemy démontrent des phénomènes de troncation concernant les protéines tau extracellulaires, présentes dans le LCR de sujets contrôles (CTRL) ou atteints de tauopathies (Fig. 13.C) (Barthélemy, Gabelle, et al. 2016). Les protéines tau extracellulaires retrouvées dans le LCR humain sont majoritairement des espèces 1N comprenant le domaine riche en prolines de la protéine tau et tronquées au niveau des acides aminés 222-225 (Sato et al. 2018). En conséquence, ces espèces extracellulaires libres, potentiellement impliquées dans la propagation intracérébrale des tauopathies, n'inclueraient pas le domaine MTBR (Barthélemy, Gabelle, et al. 2016; Sato et al. 2018).

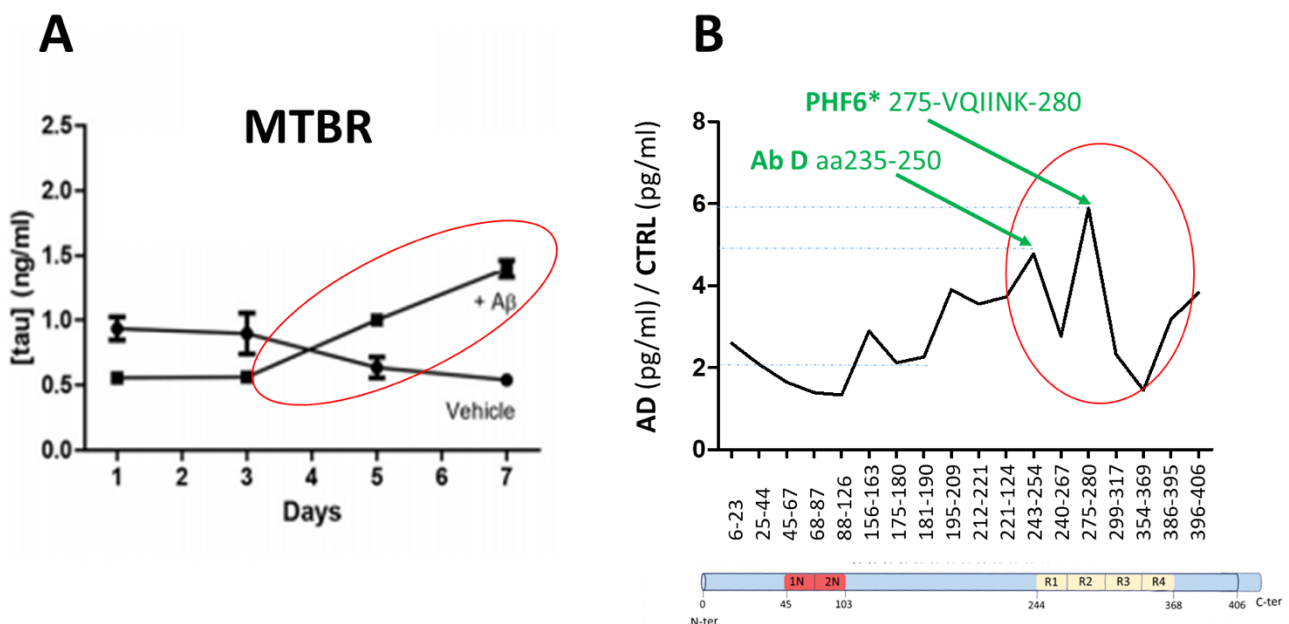


**Figure 13 : Caractérisation des protéines tau extracellulaires.** (A) Les protéines tau intracellulaires au sein de cultures primaires de neurones (DIV 21) sont présentes sous forme entières (FL = Full lenght). (B) Les protéines tau extracellulaires, sécrétées par les neurones primaires (DIV 21) dans le milieu de culture, incluent la région médiane de la protéine tau (aa 194 à 241) mais sont majoritairement tronquées en l'extrémité C-terminale. (C) Caractérisation par spectrométrie de masse des protéines tau extracellulaires retrouvées dans le LCR de sujets contrôles (CTRL) ou atteints de tauopathies (AD/Alzheimer's Disease, PSP/Progressive Supranuclear Palsy et DLB/Dementia with Lewy Body). Expression en pg/ml (axe y), de différents peptides (axe x) répartis sur l'ensemble de la protéine tau. A & B : Modifié de (Kanmert et al. 2015) ; C : Modifié de (Barthélemy, Gabelle, et al. 2016)

Pourtant, l'accessibilité à deux peptides pro-agrégants (PHF6 : 306-VQIVYK-311 et PHF6\* : 275-VQIINK-280), situés au cœur du domaine MTBR, semble indispensable aux protéines tau pour présenter des fonctions d'agent de nucléation (M. von Bergen et al. 2000; Martin Von Bergen et al. 2001; Mirbaha et al. 2018a). De plus, des formes tronquées de tau, suspectées pour être impliquées dans la propagation intracérébrale des tauopathies de par leur capacité agrégatives supérieures, incluent généralement le domaine MTBR (J.-H. Cho and Johnson 2004; Matsumoto et al. 2015).

Les travaux de Kanmert et collaborateurs montrent *in vitro*, qu'en cas de souffrance neuronale, une augmentation de la sécrétion ou la libération d'espèces de protéines tau incluant le domaine MTBR est observée (Fig. 14.A) (Kanmert et al. 2015).

Si nous transposons cette observation *in vivo*, en regard des sujets contrôles et en réponse à la dégénérescence neuronale, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer devraient également présenter une augmentation de la libération d'espèces de protéine tau incluant le domaine de liaison aux microtubules. Les formes extracellulaires de tau incluant le domaine MTBR étant minoritaires, l'échelle de la figure 13.C ne permet pas de juger d'une possible augmentation ciblée de la libération d'espèces incluant le domaine MTBR chez les patients Alzheimer. L'utilisation des valeurs brutes extraites des travaux de Barthelemy a permis de réaliser, puis analyser pour chaque peptide, le ratio entre la quantité rapportée en pg/ml mesurée chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, en regard de celle observée chez les sujets contrôles (Fig. 14.B). Cette opération avait pour objectif de déterminer si l'augmentation des espèces extracellulaires de tau observée chez les patient Alzheimer était homogène ou concernait certains peptides en particulier.



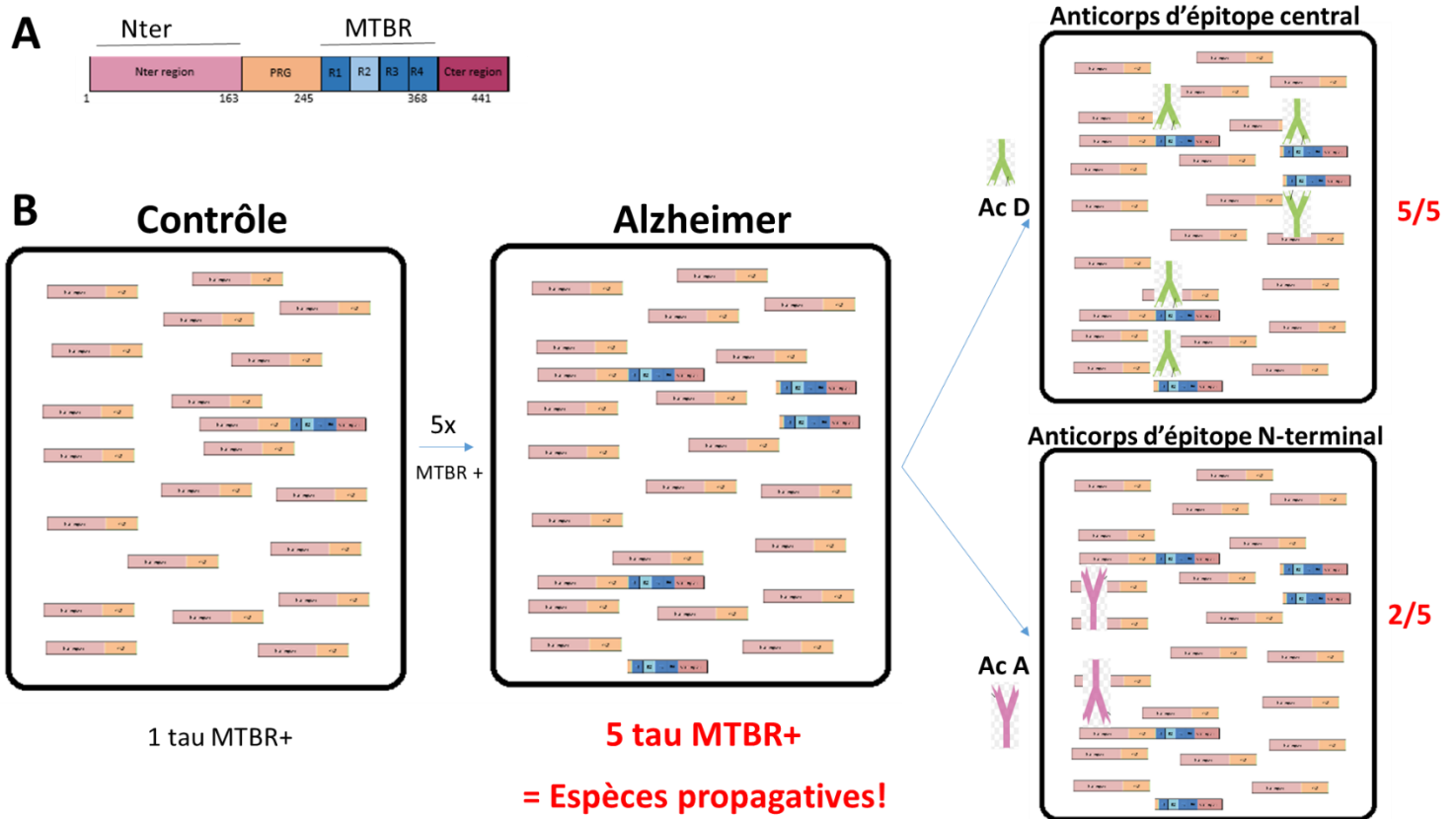
**Figure 14 : Augmentation de la sécrétion/libération d'espèces de tau incluant le domaine MTBR dans le milieu extracellulaire en cas de souffrance neuronale. (A)** Quantité de protéines tau (ng/ml) incluant le domaine MTBR (axe y) dans le milieu extracellulaire de neurones primaires en condition contrôle (vehicle) ou incubés en présence de 20 µM de peptide amyloïde beta 42 (Aβ) pendant 1, 3, 5 et 7 jours. **(B)** Analyse par spectrométrie de masse des protéines tau extracellulaires présentes dans le LCR humain de sujets contrôles et de patients atteints d'Alzheimer. Ratio entre la quantité rapportée en pg/ml mesurée chez les patients atteints d'Alzheimer (AD) en regard de la quantité observée chez les sujets contrôles (axe y) pour un ensemble de peptides répartis sur la protéine tau (axe x). **A** : Modifié de (Kanmert et al. 2015) ; **B** : créé sur base de (Barthélemy, Gabelle, et al. 2016).

En adéquation avec les travaux de Kanmert, il semblerait qu'en regard des sujets contrôles, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent un plus haut pourcentage de formes extracellulaires incluant le domaine MTBR (Barthélemy, Gabelle, et al. 2016) (Fig. 14.B). Une autre observation intéressante est que le peptique le plus augmenté chez les patients atteints d'Alzheimer (6x) en regard des sujets contrôles, comprend la séquence de l'hexapeptide PHF6\*, un des 2 sites définis comme essentiels à l'agrégation de tau (Martin Von Bergen et al. 2001; Mirbaha et al. 2018a).

Les valeurs en pg/ml associées aux peptides localisés dans le domaine MTBR étant très basses et relativement proches de la limite de détection, les valeurs numériques d'augmentation du nombre de peptides chez les patients Alzheimer en regard des sujets contrôles apportent de précieuses informations qualitatives mais l'interprétation quantitative est à prendre avec parcimonie (Fig. 14.B) (Barthélemy, Gabelle, et al. 2016).

En lien avec ces observations, je voudrais terminer ce manuscrit en vous faisant part d'une hypothèse personnelle concernant les espèces extracellulaires de la protéine tau, responsables de la propagation intracérébrale des tauopathies. L'hypothèse que je vais vous présenter est en accord avec les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de thèse et pourrait expliquer la moindre efficacité de l'anticorps A dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine tau, en comparaison à l'anticorps D ciblant la région centrale de la protéine (Fig. 15.B).

De mon point de vue, il est peu probable que les formes extracellulaires de tau les plus abondantes et exemptes de l'extrémité C-terminale soient impliquées dans la propagation des tauopathies. Je pense que les réelles espèces toxiques propagatives sont les espèces incluant le domaine MTBR (plus précisément la région R1 comportant l'hexapeptide PHF6\*) dont la libération serait augmentée en réponse à la dégénérescence neuronale propre aux tauopathies, telle la maladie d'Alzheimer (Fig. 15.B). Je rajoute également qu'il est fort probable qu'une partie des espèces propagatives soient tronquées en l'extrémité N-terminale.



**Figure 15 : Hypothèse concernant la nature des réelles espèces toxiques de tau, responsables de la propagation intracérébrale des tauopathies. (A) Schéma de la protéine tau. (B) Illustration des espèces extracellulaires de tau retrouvées chez les sujets contrôles et atteints de maladie d'Alzheimer, hypothèse de travail sur la capacité de neutralisation d'anticorps d'épitope central (exemple : anticorps D) ou N-terminal (exemple : anticorps A), si les réelles espèces toxiques propagatives sont les espèces minoritaires de tau incluant le domaine MTBR.**

Selon cette hypothèse, un anticorps ciblant la région riche en prolines, reconnaîtra les espèces extracellulaires majoritaires de tau, très abondantes mais non impliquées dans la propagation, ce qui laisse présager un manque total de spécificité et d'efficacité. Un anticorps dirigé contre l'extrémité N-terminale gagnera en spécificité de par une moindre, voire une absence de reconnaissance de ces espèces majoritaires non propagatives. Cependant, au vu du haut risque de clivage en amont de la région riche en prolines (acide aminé 126, (Fig. 13.C), ces anticorps Nter ne seront probablement pas en mesure de reconnaître l'ensemble des espèces MTBR positives, impliquées dans la propagation. En effet, sur base de l'analyse des valeurs brutes extraites des travaux de Barthélémy, la quantité des peptides N-terminaux augmenterait d'environ 2x chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer en regard d'une augmentation de 6x pour le peptide PHF6\* (Fig. 14.B) (Barthélémy, Gabelle, et al. 2016).

Restent les anticorps centraux, tel que l'anticorps D dont l'épitope (acides aminés 235-250), proche du peptide PHF6\*, permettrait une reconnaissance spécifique des espèces minoritaires propagatives, incluant le domaine MTBR (Fig. 15.B). En effet, selon la figure 14.B, le peptide porteur de l'épitope de l'anticorps D serait augmenté de près de 5x chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, la proximité de l'épitope de l'anticorps D avec l'hexapeptide PHF6\* suppose un risque moindre de clivage, ce qui renforce l'hypothèse d'une grande spécificité de l'anticorps D envers les espèces minoritaires incluant le domaine MTBR et impliquées dans la propagation. .

Si cette hypothèse personnelle se révèle exacte, l'anticorps idéal en vue de bloquer la propagation intracérébrale des tauopathies présenterait un épitope au sein même du domaine PHF6\*. Cependant, les séquences MTBR étant peu immunogènes de par leur haute homologie de séquence inter-espèces, le mieux que nous puissions espérer actuellement, est un anticorps, tel l'anticorps D (Courade et al. 2018) ou encore l'anticorps PT76 (Vandermeeren et al. 2018), présentant des épitopes relativement proches du domaine PHF6\*.

Bien que cette hypothèse se base essentiellement sur des données récoltées au départ de LCR humain et non de liquide interstitiel (ISF), cette réflexion ainsi que les résultats générés dans ce travail de thèse seront à prendre en considération lors de l'analyse des essais cliniques d'immunothérapie actuellement en phase 2, dirigés contre ces différentes régions de la protéine tau.



*En conclusion, au cours de ce projet de thèse, nous avons développé deux modèles murins de tauopathies qui ont permis de démontrer la capacité de l'anticorps D à neutraliser les espèces pathologiques présentes dans un homogénat de cerveau issu d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer et également sa capacité à s'opposer à la propagation intercellulaire de la tauopathie in vivo. Dans le modèle de nucléation, les effets de l'anticorps D, ciblant la protéine tau en un épitope central (acides aminés 235 à 250), ont été comparés à ceux de l'anticorps A, de même isotype et associé à des propriétés de liaison comparables mais reconnaissant la protéine tau en son extrémité N-terminale (acides aminés 15 à 24). Ces résultats confirment les travaux préliminaires de caractérisation de ces anticorps dans un modèle in vitro d'agrégation de tau (Courade et al. 2018) et soulignent l'importance considérable du choix de l'épitope en vue de prévenir le développement de tauopathies chez l'homme. Au regard de ces résultats in vivo très prometteurs, la version humanisée de l'anticorps D (UCB0107) est entrée, en 2018, en essai clinique de phase 1 en vue de tester son innocuité chez des patients sains. La phase 1 aujourd'hui validée, un essai clinique de phase 2 devrait débiter en 2019.*

*Enfin, nos travaux soulignent la nécessité de tester les anticorps thérapeutiques potentiels au sein de plusieurs modèles permettant à la fois d'évaluer leur capacité à neutraliser des amorces pathologiques présentes chez l'homme mais également leur capacité à prévenir la propagation d'espèces extracellulaires de la protéine tau en vue de prédire des effets bénéfiques potentiels chez l'homme.*

# Bibliographie

- Aboutit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., de Chaumont, F., Pieri, L., ... Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar  $\alpha$ -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/emj.201593411>
- Adolfsson, O., Pihlgren, M., Toni, N., Varisco, Y., Buccarello, A. L., Antonello, K., ... Watts, R. J. (2012). An Effector-Reduced Anti- $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) Antibody with Unique A $\beta$  Binding Properties Promotes Neuroprotection and Glial Engulfment of A $\beta$ . *Journal of Neuroscience*, 32(28), 9677–9689. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4742-11.2012>
- Afadzi, M., Strand, S., Nilssen, E. A., Masoy, S. E., Johansen, T., Hansen, R., ... De L. Davies, C. (2013). Mechanisms of the ultrasound-mediated intracellular delivery of liposomes and dextrans. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*. <https://doi.org/10.1109/TUFFC.2013.2534>
- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M. (2012). scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
- Ahmed, Z., Bigio, E. H., Budka, H., Dickson, D. W., Ferrer, I., Ghetti, B., ... Kovacs, G. G. (2013). Globular glial tauopathies (GGT): Consensus recommendations. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1171-0>
- Ahmed, Z., Cooper, J., Murray, T. K., Garn, K., McNaughton, E., Clarke, H., ... O'Neill, M. J. (2014). A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: The pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1254-6>
- Ahmed, Z., Doherty, K. M., Silveira-Moriyama, L., Bandopadhyay, R., Lashley, T., Mamais, A., ... Revesz, T. (2011). Globular glial tauopathies (GGT) presenting with motor neuron disease or frontotemporal dementia: An emerging group of 4-repeat tauopathies. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0857-4>
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., ... Goedert, M. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2221-02.2002> [pii]
- Alonso, A. d. C., Li, B., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2006). Polymerization of hyperphosphorylated tau

- into filaments eliminates its inhibitory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0603214103>
- Alonso, A. d. C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(12), 6923–6928. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>
- Alonso, A. D., Di Clerico, J., Li, B., Corbo, C. P., Alaniz, M. E., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2010). Phosphorylation of Tau at Thr<sup>212</sup>, Thr<sup>231</sup>, and Ser<sup>262</sup> Combined Causes Neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(40), 30851–30860. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110957>
- Ando, K., Kabova, A., Stygelbout, V., Leroy, K., Heraud, C., Frédérick, C., ... Brion, J.-P. (2014). Vaccination with Sarkosyl Insoluble PHF-Tau Decrease Neurofibrillary Tangles Formation in Aged Tau Transgenic Mouse Model: A Pilot Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, *40*(s1), S135–S145. <https://doi.org/10.3233/JAD-132237>
- Andorfer, C., Acker, C. M., Kress, Y., Hof, P. R., Duff, K., & Davies, P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(22), 5446–5454. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4637-04.2005>
- Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., & Van Hoesen, G. W. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with alzheimer's disease. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.1.103>
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., ... Ikezu, T. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>
- Asuni, A. A., Boutajangout, A., Quartermain, D., & Sigurdsson, E. M. (2007a). Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements. *Journal of Neuroscience*, *27*(34), 9115–9129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>
- Asuni, A. A., Boutajangout, A., Quartermain, D., & Sigurdsson, E. M. (2007b). Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>

- Audouard, E., Houben, S., Masaracchia, C., Yilmaz, Z., Suain, V., Authelet, M., ... Brion, J. P. (2016). High-Molecular-Weight Paired Helical Filaments from Alzheimer Brain Induces Seeding of Wild-Type Mouse Tau into an Argyrophilic 4R Tau Pathology in Vivo. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.008>
- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M., & Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>
- Avila, J., Santa-María, I., Pérez, M., Hernández, F., & Moreno, F. (2006). Tau phosphorylation, aggregation, and cell toxicity. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2006(3), 74539. <https://doi.org/10.1155/JBB/2006/74539>
- Babić, M., Švob Štrac, D., Mück-Šeler, D., Pivac, N., Stanić, G., Hof, P. R., & Šimić, G. (2014). Update on the core and developing cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer disease. *Croatian Medical Journal*. <https://doi.org/10.3325/cmj.2014.55.347>
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., ... Yednock, T. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid  $\beta$ -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/78682>
- Barthélemy, N. R., Fenaille, F., Hirtz, C., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Vialaret, J., ... Becher, F. (2016). Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 667–676. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01001>
- Barthélemy, N. R., Gabelle, A., Hirtz, C., Fenaille, F., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., ... Lehmann, S. (2016). Differential Mass Spectrometry Profiles of Tau Protein in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and Dementia with Lewy Bodies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(4), 1033–1043. <https://doi.org/10.3233/JAD-150962>
- Basurto-Islas, G., Grundke-Iqbal, I., Tung, Y. C., Liu, F., & Iqbal, K. (2013). Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446070>
- Basurto-Islas, G., Luna-Muñoz, J., Guillozet-Bongaarts, A. L., Binder, L. I., Mena, R., & García-Sierra, F. (2008). Accumulation of Aspartic Acid<sup>421</sup>- and Glutamic Acid<sup>391</sup>-Cleaved Tau in Neurofibrillary Tangles Correlates With Progression in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology &*

*Experimental Neurology*, 67(5), 470–483. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31817275c7>

Baudier, J., & Cole, R. D. (1987). Phosphorylation of tau proteins to a state like that in Alzheimer's brain is catalyzed by a calcium/calmodulin-dependent kinase and modulated by phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*.

Baumann, K., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H., & Mandelkow, E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80849-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80849-P)

Bi, M., Ittner, A., Ke, Y. D., Götz, J., & Ittner, L. M. (2011). Tau-Targeted Immunization Impedes Progression of Neurofibrillary Histopathology in Aged P301L Tau Transgenic Mice. *PLoS ONE*, 6(12), e26860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026860>

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*, 11(1), 153–163. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8393323>

Biernat, J., & Mandelkow, E.-M. (1999). The Development of Cell Processes Induced by tau Protein Requires Phosphorylation of Serine 262 and 356 in the Repeat Domain and Is Inhibited by Phosphorylation in the Proline-rich Domains. *Molecular Biology of the Cell*, 10(3), 727–740. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.3.727>

Biernat, J., Wu, Y.-Z., Timm, T., Zheng-Fischhöfer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L., & Mandelkow, E.-M. (2002). Protein Kinase MARK/PAR-1 Is Required for Neurite Outgrowth and Establishment of Neuronal Polarity. *Molecular Biology of the Cell*, 13(11), 4013–4028. <https://doi.org/10.1091/mbc.02-03-0046>

Blanquet, V., Goldgaber, D., Turleau, C., Créau-Goldberg, N., Delabar, J., Sinet, P. M., ... de Grouchy, J. (1987). The beta amyloid protein (AD-AP) cDNA hybridizes in normal and Alzheimer individuals near the interface of 21q21 and q22.1. *Annales de Génétique*.

Blennow, K. (2017). A Review of Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease: Moving from CSF to Blood. *Neurology and Therapy*. <https://doi.org/10.1007/s40120-017-0073-9>

Boimel, M., Grigoriadis, N., Lourdopoulos, A., Haber, E., Abramsky, O., & Rosenmann, H. (2010). Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. *Experimental Neurology*, 224(2), 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.05.010>

- Boluda, S., Iba, M., Zhang, B., Raible, K. M., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2015). Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>
- Botez, G., Probst, A., Ipsen, S., & Tolnay, M. (1999). Astrocytes expressing hyperphosphorylated tau protein without glial fibrillary tangles in argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s004010051077>
- Bou Samra, E., Buhagiar-Labarchède, G., Machon, C., Guitton, J., Onclercq-Delic, R., Green, M. R., ... Amor-Guéret, M. (2017). A role for Tau protein in maintaining ribosomal DNA stability and cytidine deaminase-deficient cell survival. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00633-1>
- Boutajangout, A., Ingadottir, J., Davies, P., & Sigurdsson, E. M. (2011). Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. *Journal of Neurochemistry*, *118*(4), 658–667. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07337.x>
- Boutajangout, A., Quartermain, D., & Sigurdsson, E. M. (2010). Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model. *Journal of Neuroscience*, *30*(49), 16559–16566. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010>
- Boutajangout, A., & Wisniewski, T. (2014). Tau-Based Therapeutic Approaches for Alzheimer's Disease - A Mini-Review. *Gerontology*. <https://doi.org/10.1159/000358875>
- Bowman, G. L., Kaye, J. A., Moore, M., Waichunas, D., Carlson, N. E., & Quinn, J. F. (2007). Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: Stability and functional significance. *Neurology*. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000262031.18018.1a>
- Braak, H., & Braak, E. (1987). Argyrophilic grains: characteristic pathology of cerebral cortex in cases of adult onset dementia without Alzheimer changes. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90204-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90204-7)
- Braak, H., & Braak, E. (1995). Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging*. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00021-6](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00021-6)
- Braak, H., Braak, E., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1986). Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neuroscience Letters*, *65*(3), 351–355. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2423928>

- Bright, J., Hussain, S., Dang, V., Wright, S., Cooper, B., Byun, T., ... Griswold-Prenner, I. (2015). Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiology of Aging*, *36*(2), 693–709. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.007>
- Brion, J. P., Smith, C., Couck, A. M., Gallo, J. M., & Anderton, B. H. (1993). Developmental Changes in  $\tau$  Phosphorylation: Fetal  $\tau$  Is Transiently Phosphorylated in a Manner Similar to Paired Helical Filament $\tau$  Characteristic of Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb07444.x>
- Bros, P., Vialaret, J., Barthelemy, N., Delatour, V., Gabelle, A., Lehmann, S., & Hirtz, C. (2015). Antibody-free quantification of seven tau peptides in human CSF using targeted mass spectrometry. *Frontiers in Neuroscience*, *9*, 302. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00302>
- Brown, P., Gibbs, C. J., Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M. P., Bacote, A., ... Gajdusek, D. C. (1994). Human spongiform encephalopathy: The national institutes of health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.410350504>
- Buée-Scherrer, V., Condamines, O., Mourton-Gilles, C., Jakes, R., Goedert, M., Pau, B., & Delacourte, A. (1996). AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(96\)00003-4](https://doi.org/10.1016/0169-328X(96)00003-4)
- Buée, L., Bussi re, T., Bu e-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *33*(1), 95–130. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967355>
- Burnouf, S., Martire, A., Derisbourg, M., Laurent, C., Belarbi, K., Leboucher, A., ... Blum, D. (2013). NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model. *Aging Cell*, *12*(1), 11–23. <https://doi.org/10.1111/acer.12018>
- Caillierez, R., Bégard, S., Lécolle, K., Deramecourt, V., Zommer, N., Dujardin, S., ... Colin, M. (2013). Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.66>
- Calafate, S., Buist, A., Miskiewicz, K., Vijayan, V., Daneels, G., de Strooper, B., ... Moechars, D. (2015).

- Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation. *Cell Reports*.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>
- Caricasole, A., Copani, A., Caraci, F., Aronica, E., Rozemuller, A. J., Caruso, A., ... Nicoletti, F. (2004). Induction of Dickkopf-1, a Negative Modulator of the Wnt Pathway, Is Associated with Neuronal Degeneration in Alzheimer's Brain. *Journal of Neuroscience*, *24*(26), 6021–6027.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1381-04.2004>
- Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., ... Holtzman, D. M. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- $\beta$  peptide clearance. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002156>
- Castillo-Carranza, D. L., Gerson, J. E., Sengupta, U., Guerrero-Muñoz, M. J., Lasagna-Reeves, C. A., & 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. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-132477>
- Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Lasagna-Reeves, C. A., Gerson, J. E., Singh, G., ... Kaye, R. (2014). Passive Immunization with Tau Oligomer Monoclonal Antibody Reverses Tauopathy Phenotypes without Affecting Hyperphosphorylated Neurofibrillary Tangles. *Journal of Neuroscience*, *34*(12), 4260–4272. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3192-13.2014>
- Chai, X., Wu, S., Murray, T. K., Kinley, R., Cella, C. V., Sims, H., ... Citron, M. (2011). Passive Immunization with Anti-Tau Antibodies in Two Transgenic Models. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(39), 34457–34467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229633>
- Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Zhong, M., ... Yu, Z. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International*, *60*(3), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.013>
- Chen, S., Li, B., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2008). I1PP2A affects Tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709852200>
- Cho, J.-H., & Johnson, G. V. W. (2003). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02155.x>
- Cho, J.-H., & Johnson, G. V. W. (2004). Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Induces Caspase-cleaved Tau Aggregation *in Situ*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(52), 54716–54723.



<https://doi.org/10.1074/jbc.M403364200>

- Cho, J. H., & Johnson, G. V. W. (2003). Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  phosphorylates tau at both primed and unprimed sites: Differential impact on microtubule binding. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206236200>
- Chong, F. P., Ng, K. Y., Koh, R. Y., & Chye, S. M. (2018). Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0574-1>
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., ... Selkoe, D. J. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0197-67>
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R. A., Frank, S., Hench, J., ... Tolnay, M. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., ... Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
- Clavaguera, F., Hench, J., Lavenir, I., Schweighauser, G., Frank, S., Goedert, M., & Tolnay, M. (2014). Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1231-5>
- Collin, L., Bohrmann, B., Göpfert, U., Oroszlan-Szovik, K., Ozmen, L., & Grüniger, F. (2014). Neuronal uptake of tau/pS422 antibody and reduced progression of tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain*, 137(10), 2834–2846. <https://doi.org/10.1093/brain/awu213>
- Comoy, E. E., Mikol, J., Luccantoni-Freire, S., Correia, E., Lescoutra-Etcheagaray, N., Durand, V., ... Deslys, J. P. (2015). Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep11573>
- Congdon, E. E., Lin, Y., Rajamohamedsait, H. B., Shamir, D. B., Krishnaswamy, S., Rajamohamedsait, W. J., ... Sigurdsson, E. M. (2016). Affinity of Tau antibodies for solubilized pathological Tau species but not their immunogen or insoluble Tau aggregates predicts in vivo and ex vivo efficacy. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0126-z>
- Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2018). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>

- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., ... Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>
- Courade, J. P., Angers, R., Mairet-Coello, G., Pacico, N., Tyson, K., Lightwood, D., ... Citron, M. (2018). Epitope determines efficacy of therapeutic anti-Tau antibodies in a functional assay with human Alzheimer Tau. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1911-2>
- Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P., & Yang, A. J. (2006). Alzheimer Disease-specific Conformation of Hyperphosphorylated Paired Helical Filament-Tau Is Polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 Ubiquitin Conjugation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 10825–10838. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512786200>
- Crowther, R. A. (1991). Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2288>
- Cruchaga, C., Karch, C. M., Jin, S. C., Benitez, B. A., Cai, Y., Guerreiro, R., ... Goate, A. M. (2014). Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12825>
- Cynis, H., Frost, J. L., Crehan, H., & Lemere, C. A. (2016). Immunotherapy targeting pyroglutamate-3 A $\beta$ : Prospects and challenges. *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0115-2>
- Czech, C., Tremp, G., & Pradier, L. (2000). Presenilins and Alzheimer's disease: Biological functions and pathogenic mechanisms. *Progress in Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00033-7)
- d'Abramo, C., Acker, C. M., Jimenez, H., & Davies, P. (2015). Passive Immunization in JNPL3 Transgenic Mice Using an Array of Phospho-Tau Specific Antibodies. *PLOS ONE*, 10(8), e0135774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135774>
- d'Abramo, C., Acker, C. M., Jimenez, H. T., & Davies, P. (2013). Tau Passive Immunotherapy in Mutant P301L Mice: Antibody Affinity versus Specificity. *PLoS ONE*, 8(4), e62402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062402>
- D'Orange, M., Aurégan, G., Cheramy, D., Gaudin-Guérif, M., Lieger, S., Guillemier, M., ... Cambon, K. (2018). Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awx342>

- Dai, C. L., Hu, W., Tung, Y. C., Liu, F., Gong, C. X., & Iqbal, K. (2018). Tau passive immunization blocks seeding and spread of Alzheimer hyperphosphorylated Tau-induced pathology in 3 × Tg-AD mice. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0341-7>
- Dai, C. ling, Tung, Y. C., Liu, F., Gong, C. X., & Iqbal, K. (2017). Tau passive immunization inhibits not only tau but also A $\beta$  pathology. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0227-5>
- Davtyan, H., Chen, W. W., Zagorski, K., Davis, J., Petrushina, I., Kazarian, K., ... Ghochikyan, A. (2017). MultiTEP platform-based DNA epitope vaccine targeting N-terminus of tau induces strong immune responses and reduces tau pathology in THY-Tau22 mice. *Vaccine*, 35(16), 2015–2024. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.020>
- De Boni, U., & Crapper, D. R. (1978). Paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured neurones. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/271566a0>
- De Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., ... Hyman, B. T. (2012). Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>
- De Silva, R., Lashley, T., Gibb, G., Hanger, D., Hope, A., Reid, A., ... Lees, A. (2003). Pathological inclusion bodies in tauopathies contain distinct complements of tau with three or four microtubule-binding repeat domains as demonstrated by new specific monoclonal antibodies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2003.00463.x>
- Del C. Alonso, A., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0796-783>
- Del Ser, T., Steinwachs, K. C., Gertz, H. J., Andrés, M. V., Gómez-Carrillo, B., Medina, M., ... León, T. (2013). Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: A pilot study. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120805>
- Dickey, C. A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R. M., Dunmore, J., ... Petrucelli, L. (2007). The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 648–658. <https://doi.org/10.1172/JCI29715>
- Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80208-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80208-1)

- Duff, K., & Planel, E. (2005). Untangling memory deficits. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0805-826>
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., ... Colin, M. (2014). Ectosomes: A new mechanism for non-exosomal secretion of Tau protein. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>
- Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., ... Buée, L. (2014). Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: Relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>
- Duyckaerts, C., Sazdovitch, V., Ando, K., Seilhean, D., Privat, N., Yilmaz, Z., ... Haïk, S. (2018). Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt–Jakob disease and immunoassay of French cadaver-sourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of Abeta pathology. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1791-x>
- Falcon, B., Cavallini, A., Angers, R., Glover, S., Murray, T. K., Barnham, L., ... Bose, S. (2015). Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589309>
- Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., Vidal, R., ... Goedert, M. (2018). Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0454-y>
- Ferrer, I., López-González, I., Carmona, M., Arregui, L., Dalfó, E., Torrejón-Escribano, B., ... Kovacs, G. G. (2014). Glial and neuronal tau pathology in tauopathies: Characterization of disease-specific phenotypes and tau pathology progression. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1097/NEN.000000000000030>
- Ferrer, I., Santpere, G., & Van Leeuwen, F. W. (2008). Argyrophilic grain disease. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awm305>
- Fitzpatrick, A. W. P., Falcon, B., He, S., Murzin, A. G., Murshudov, G., Garringer, H. J., ... Scheres, S. H. W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature23002>
- Forest, S. K., Acker, C. M., D'abramo, C., & Davies, P. (2013). Methods for measuring tau pathology in transgenic mouse models. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012->

- Fraser, P. E. (2014). Prions and prion-like proteins. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.583492>
- Freeman, G. B., Brown, T. P., Wallace, K., & Bales, K. R. (2012). Chronic administration of an aglycosylated murine antibody of ponzemab does not worsen microhemorrhages in aged Tg2576 mice. *Current Alzheimer Research*, 9(9), 1059–1068. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22631613>
- Frost, B., & Diamond, M. I. (2010). Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2786>
- Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Furman, J. L., Vaquer-Alicea, J., White, C. L., Cairns, N. J., Nelson, P. T., & Diamond, M. I. (2017). Widespread tau seeding activity at early Braak stages. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1644-z>
- Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., Hardlund, J. H., ... Wischik, C. M. (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31275-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31275-2)
- George-Hyslop, P. S., Haines, J., Rogaev, E., Mortilla, M., Vaula, G., Pericak-Vance, M., ... McLachlan, D. C. (1992). Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1292-330>
- Gerson, J., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Bodani, R., Prough, D. S., DeWitt, D. S., ... Kayed, R. (2016). Tau Oligomers Derived from Traumatic Brain Injury Cause Cognitive Impairment and Accelerate Onset of Pathology in Htau Mice. *Journal of Neurotrauma*, 33(22), 2034–2043. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4262>
- Gibbons, G. S., Banks, R. A., Kim, B., Changolkar, L., Riddle, D. M., Leight, S. N., ... Lee, V. M. Y. (2018). Detection of Alzheimer disease (AD)-specific tau pathology in AD and nonAD tauopathies by immunohistochemistry with novel conformation-selective tau antibodies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly010>
- Gibbs, C. J., Amyx, H. L., Bacote, A., Masters, C. L., & Gajdnsek, D. C. (1980). Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *Journal of Infectious Diseases*.

<https://doi.org/10.1093/infdis/142.2.205>

- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., ... Hardy, J. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Cohen, P., Vanmechelen, E., Vandermeeren, M., & Cras, P. (1994). Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *The Biochemical Journal*, *301* ( Pt 3), 871–877. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519852>
- Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Six, J., Lübke, U., Vandermeeren, M., ... Lee, V. M. (1993). The abnormal phosphorylation of tau protein at Ser-202 in Alzheimer disease recapitulates phosphorylation during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(11), 5066–5070. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8506352>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., & Crowther, R. A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO Journal*, *8*(2), 393–399. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2498079>
- Gong, C. X., Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *Journal of Neurochemistry*, *61*(3), 921–927. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395566>
- Groenning, M. (2010). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *Journal of Chemical Biology*. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0027-5>
- Gu, J., Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2013). Two Novel Tau Antibodies Targeting the 396/404 Region Are Primarily Taken Up by Neurons and Reduce Tau Protein Pathology. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(46), 33081–33095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494922>
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., ... Hardy, J. (2013). *TREM2* Variants in Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211851>
- Guo, J. L., & Lee, V. M. Y. (2011). Seeding of normal tau by pathological tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *Journal of Biological Chemistry*.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209296>

- Guo, J. L., Narasimhan, S., Changolkar, L., He, Z., Stieber, A., Zhang, B., ... Lee, V. M. Y. (2016). Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20160833>
- Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, *133*(5), 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Hanger, D. P., Byers, H. L., Wray, S., Leung, K.-Y., Saxton, M. J., Seereeram, A., ... Anderton, B. H. (2007). Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(32), 23645–23654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703269200>
- Hanger, D. P., Hughes, K., Woodgett, J. R., Brion, J. P., & Anderton, B. H. (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: Generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90774-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90774-2)
- Hansson, O., Zetterberg, H., Buchhave, P., Londos, E., Blennow, K., & Minthon, L. (2006). Association between CSF biomarkers and incipient Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment: a follow-up study. *The Lancet Neurology*, *5*(3), 228–234. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70355-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70355-6)
- Hardy, J. (2006). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis: An update and reappraisal. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2006-9S317>
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K., & Ihara, Y. (1992). Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *Journal of Biological Chemistry*.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y., & Okabe, S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *The Journal of Cell Biology*, *107*(4), 1449–1459. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3139677>
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J. C., Carrasquillo, M. M., ... Williams, J. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.803>

- Holmes, B. B., DeVos, S. L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., ... Diamond, M. I. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>
- Holmes, B. B., & Diamond, M. I. (2014). Prion-like properties of Tau protein: The importance of extracellular Tau as a therapeutic target. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.549295>
- Hoover, B. R., Reed, M. N., Su, J., Penrod, R. D., Kotilinek, L. A., Grant, M. K., ... Liao, D. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron*, 68(6), 1067–1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>
- Hu, W., Zhang, X., Tung, Y. C., Xie, S., Liu, F., & Iqbal, K. (2016). Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimer's and Dementia*. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.014>
- Iba, M., Guo, J. L., McBride, J. D., Zhang, B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2013). Synthetic Tau Fibrils Mediate Transmission of Neurofibrillary Tangles in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's-Like Tauopathy. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R., & Ogawara, M. (1986). Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in alzheimer's disease. *Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135662>
- Iliff, J. J., Chen, M. J., Plog, B. A., Zeppenfeld, D. M., Soltero, M., Yang, L., ... Nedergaard, M. (2014). Impairment of Glymphatic Pathway Function Promotes Tau Pathology after Traumatic Brain Injury. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3020-14.2014>
- Iqbal, K., & Dai, C. (2015). Rescue of pathology and cognitive impairment by tau immunotherapy at a moderate to severe stage of the disease in 3xTg-Alzheimer's disease mice. *Alzheimer's and Dementia*. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.07.258>
- Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C.-X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nature Reviews Neurology*, 12(1), 15–27. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.225>
- Iqbal, K., Zaidi, T., Wen, G. Y., Grundke-Iqbal, I., Merz, P. A., Shaikh, S. S., ... Winblad, B. (1986). DEFECTIVE BRAIN MICROTUBULE ASSEMBLY IN ALZHEIMER'S DISEASE. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)92134-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)92134-3)



- Ironside, J. W., Ritchie, D. L., & Head, M. W. (2005). Phenotypic variability in human prion diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 31(6), 565–579. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2005.00697.x>
- Irwin, D. J., Brettschneider, J., McMillan, C. T., Cooper, F., Olm, C., Arnold, S. E., ... Trojanowski, J. Q. (2016). Deep clinical and neuropathological phenotyping of Pick disease. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.24559>
- Ising, C., Gallardo, G., Leyns, C. E. G., Wong, C. H., Jiang, H., Stewart, F., ... Holtzman, D. M. (2017a). AAV-mediated expression of anti-tau scFvs decreases tau accumulation in a mouse model of tauopathy. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20162125>
- Ising, C., Gallardo, G., Leyns, C. E. G., Wong, C. H., Jiang, H., Stewart, F., ... Holtzman, D. M. (2017b). AAV-mediated expression of anti-tau scFvs decreases tau accumulation in a mouse model of tauopathy. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1227–1238. <https://doi.org/10.1084/jem.20162125>
- Itoh, N., Arai, H., Urakami, K., Ishiguro, K., Ohno, H., Hampel, H., ... Imahori, K. (2001). Large-scale, multicenter study of cerebrospinal fluid tau protein phosphorylated at serine 199 for the antemortem diagnosis of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.1054>
- Ittner, A., Bertz, J., Suh, L. S., Stevens, C. H., Götz, J., & Ittner, L. M. (2015). Tau-targeting passive immunization modulates aspects of pathology in tau transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 132(1), 135–145. <https://doi.org/10.1111/jnc.12821>
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., ... Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3), 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>
- Iturria-Medina, Y., & Evans, A. C. (2015). On the central role of brain connectivity in neurodegenerative disease progression. *Frontiers in Aging Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00090>
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J. A., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., ... Westaway, D. (2000). A $\beta$  peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35050110>
- Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., & 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. *Journal of Biological*

- Chemistry*, 283(46), 32066–32076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805300200>
- Jiao, S.-S., Shen, L.-L., Zhu, C., Bu, X.-L., Liu, Y.-H., Liu, C.-H., ... Wang, Y.-J. (2016). Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Translational Psychiatry*, 6(10), e907. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.186>
- Jicha, G. A., O'Donnell, A., Weaver, C., Angeletti, R., & Davies, P. (1999). Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Neurochemistry*, 72(1), 214–224. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9886072>
- Jicha, G. A., O'Donnell, A., Weaver, C., Angeletti, R., & Davies, P. (1999). Hierarchical phosphorylation of recombinant tau by the paired-helical filament-associated protein kinase is dependent on cyclic AMP-dependent protein kinase. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0720214.x>
- Johnson, G. V. W., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*, 117(24), 5721–5729. <https://doi.org/10.1242/jcs.01558>
- Jönsson, F., & Daëron, M. (2012). Mast cells and company. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00016>
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., ... Stefansson, K. (2013). Variant of *TREM2* Associated with the Risk of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103>
- Josephs, K. A., Whitwell, J. L., Parisi, J. E., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Geda, Y. E., ... Dickson, D. W. (2008). Argyrophilic grains: a distinct disease or an additive pathology? *Neurobiology of Aging*, 29(4), 566–573. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.10.032>
- Jouanne, M., Rault, S., & Voisin-Chiret, A.-S. (2017). Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.070>
- Kanmert, D., Cantlon, A., Muratore, C. R., Jin, M., O'Malley, T. T., Lee, G., ... Walsh, D. M. (2015). C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0387-15.2015>
- Katsinelos, T., Zeitler, M., Dimou, E., Karakatsani, A., Müller, H. M., Nachman, E., ... Jahn, T. R. (2018). Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Reports*.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>

- Kaufman, S. K., Sanders, D. W., Thomas, T. L., Ruchinskas, A. J., Vaquer-Alicea, J., Sharma, A. M., ... Diamond, M. I. (2016). Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.055>
- Keck, S., Nitsch, R., Grune, T., & Ullrich, O. (2003). Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *85*(1), 115–122. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12641733>
- Keller, J. N., Hanni, K. B., & Markesbery, W. R. (2000). Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *75*(1), 436–439. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10854289>
- Kenessey, A., & Yen, S. H. C. (1993). The extent of phosphorylation of fetal tau is comparable to that of PHF-tau from Alzheimer paired helical filaments. *Brain Research*. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90478-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90478-6)
- Kfoury, N., Holmes, B. B., Jiang, H., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. (2012). Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(23), 19440–19451. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346072>
- Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., ... Mandelkow, E.-M. (2006). Inducible Expression of Tau Repeat Domain in Cell Models of Tauopathy. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(2), 1205–1214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507753200>
- Kim, W., Lee, S., Jung, C., Ahmed, A., Lee, G., & Hall, G. F. (2010). Interneuronal transfer of human tau between lamprey central neurons in situ. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1273>
- Kimura, T., Hosokawa, T., Taoka, M., Tsutsumi, K., Ando, K., Ishiguro, K., ... Hisanaga, S. (2016). Quantitative and combinatorial determination of in situ phosphorylation of tau and its FTDP-17 mutants. *Scientific Reports*, *6*(1), 33479. <https://doi.org/10.1038/srep33479>
- Kimura, T., Sharma, G., Ishiguro, K., & Hisanaga, S. I. (2018). Phospho-tau bar code: Analysis of phosphoisotypes of tau and its application to tauopathy. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00044>
- Kimura, T., Whitcomb, D. J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., ... Cho, K. (2014). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *369*(1633), 20130144.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>

- Kondo, A., Shahpasand, K., Mannix, R., Qiu, J., Moncaster, J., Chen, C.-H., ... Lu, K. P. (2015). Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature*, 523(7561), 431–436. <https://doi.org/10.1038/nature14658>
- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., & Novak, M. (2014a). First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau-tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/alzrt278>
- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., & Novak, M. (2014b). First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau–tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(4), 44. <https://doi.org/10.1186/alzrt278>
- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Skrabana, R., & Novak, M. (2014). Identification of structural determinants on tau protein essential for its pathological function: Novel therapeutic target for tau immunotherapy in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/alzrt277>
- Kovacs, G. G. (2015). Invited review: Neuropathology of tauopathies: Principles and practice. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. <https://doi.org/10.1111/nan.12208>
- Kovacs, G. G. (2017). Tauopathies. In *Handbook of Clinical Neurology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>
- Kovacs, G. G., Molnár, K., László, L., Ströbel, T., Botond, G., Hönigschnabl, S., ... Budka, H. (2011). A peculiar constellation of tau pathology defines a subset of dementia in the elderly. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0819-x>
- Krishnaswamy, S., Lin, Y., Rajamohamedsait, W. J., Rajamohamedsait, H. B., Krishnamurthy, P., & Sigurdsson, E. M. (2014). Antibody-Derived In Vivo Imaging of Tau Pathology. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2755-14.2014>
- Lardenoije, R., Iatrou, A., Kenis, G., Kompotis, K., Steinbusch, H. W. M., Mastroeni, D., ... Rutten, B. P. F. (2015). The epigenetics of aging and neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.05.002>
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G. R., & Kaye, R. (2012). Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's

- disease. *The FASEB Journal*. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199851>
- Lasagna-Reeves, C. A., de Haro, M., Hao, S., Park, J., Rousseaux, M. W. C., Al-Ramahi, I., ... Zoghbi, H. Y. (2016). Reduction of Nuak1 Decreases Tau and Reverses Phenotypes in a Tauopathy Mouse Model. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.022>
- Le Corre, S., Klafki, H. W., Plesnila, N., Hubinger, G., Obermeier, A., Sahagun, H., ... Roder, H. M. (2006). An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), 9673–9678. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602913103>
- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., ... Ksiezak-Reding, H. (2004). Phosphorylation of Tau by Fyn: Implications for Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 24(9), 2304–2312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4162-03.2004>
- Lee, S.-H., Le Pichon, C. E., Adolfsson, O., Gafner, V., Pihlgren, M., Lin, H., ... Ayalon, G. (2016). Antibody-Mediated Targeting of Tau In Vivo Does Not Require Effector Function and Microglial Engagement. *Cell Reports*, 16(6), 1690–1700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.099>
- Legname, G., Nguyen, H.-O. B., Peretz, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2006). Continuum of prion protein structures enciphers a multitude of prion isolate-specified phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50), 19105–19110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608970103>
- Lemere, C. A., & Masliah, E. (2010). Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-B immunotherapy? *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.219>
- Leroy, K., Bretteville, A., Schindowski, K., Gilissen, E., Authélet, M., De Decker, R., ... Brion, J. P. (2007). Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070345>
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., ... Tanzi, R. E. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7638622>
- Lewczuk, P., Esselmann, H., Bibl, M., Beck, G., Maler, J. M., Otto, M., ... Wiltfang, J. (2004). Tau Protein Phosphorylated at Threonine 181 in CSF as a Neurochemical Biomarker in Alzheimer's Disease: Original Data and Review of the Literature. *Journal of Molecular Neuroscience*, 23(1–2), 115–122. <https://doi.org/10.1385/JMN:23:1-2:115>
- Li, T., & Paudel, H. K. (2006). Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Phosphorylates Alzheimer's Disease-Specific

- Ser<sup>396</sup> of Microtubule-Associated Protein Tau by a Sequential Mechanism<sup>†</sup>. *Biochemistry*, 45(10), 3125–3133. <https://doi.org/10.1021/bi051634r>
- Lindwall, G., & Cole, R. D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *Journal of Biological Chemistry*.
- Liu, F., & Gong, C.-X. (2008). Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies. *Molecular Neurodegeneration*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-3-8>
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x>
- Liu, F., Li, B., Tung, E. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C. X. (2007). Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x>
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., & Duff, K. (2012). Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>
- Liu, W., Zhao, L., Blackman, B., Parmar, M., Wong, M. Y., Woo, T., ... Paul, S. M. (2016). Vectored Intracerebral Immunization with the Anti-Tau Monoclonal Antibody PHF1 Markedly Reduces Tau Pathology in Mutant Tau Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 36(49), 12425–12435. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2016-16.2016>
- Liu, X.-A., Liao, K., Liu, R., Wang, H.-H., Zhang, Y., Zhang, Q., ... Wang, J.-Z. (2010). Tau Dephosphorylation Potentiates Apoptosis by Mechanisms Involving a Failed Dephosphorylation/Activation of Bcl-2. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(3), 953–962. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1294>
- Lobello, K., Ryan, J. M., Liu, E., Rippon, G., & Black, R. (2012). Targeting beta amyloid: A clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.1155/2012/628070>
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., & Binder, L. I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8422–8426.
- Lovestone, S., Boada, M., Dubois, B., Hüll, M., Rinne, J. O., Huppertz, H. J., ... Del Ser, T. (2015). A phase II trial of tideglusib in alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>

- Lowenberg, K., & Waggoner, R. W. (1934). Familial organic psychosis (alzheimer's type). *Archives of Neurology And Psychiatry*. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1934.02250040061004>
- Lucas, J. J., Hernández, F., Gómez-Ramos, P., Morán, M. A., Hen, R., & Avila, J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *The EMBO Journal*, *20*(1), 27–39. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.1.27>
- Luna-Muñoz, J., Chávez-Macías, L., García-Sierra, F., & 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. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2007-12410>
- Luna-Muñoz, J., García-Sierra, F., Falcón, V., Menéndez, I., Chávez-Macías, L., & Mena, R. (2005). Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-8104>
- Malia, T. J., Teplyakov, A., Ernst, R., Wu, S. J., Lacy, E. R., Liu, X., ... Gilliland, G. L. (2016). Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1002/prot.24988>
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., ... Bonnefoy, E. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Scientific Reports*, *6*, 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep33047>
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleux, A., Dumont, J., ... Blum, D. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *The Journal of Experimental Medicine*, *214*(8), 2257–2269. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>
- Maslah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., ... Schenk, D. (2005). Effects of  $\alpha$ -synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.010>
- Matsumoto, S. E., Motoi, Y., Ishiguro, K., Tabira, T., Kametani, F., Hasegawa, M., & Hattori, N. (2015). The twenty-four kDa C-terminal tau fragment increases with aging in tauopathy mice: Implications of prion-like properties. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv351>

- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., ... Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1197623>
- McMillan, P. J., Kraemer, B. C., Robinson, L., Leverenz, J. B., Raskind, M., & Schellenberg, G. (2011). Truncation of tau at E391 Promotes Early Pathologic Changes in Transgenic Mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 70(11), 1006–1019. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31823557fb>
- Metuzals, J., Robitaille, Y., Houghton, S., Gauthier, S., & Leblanc, R. (1988). Paired helical filaments and the cytoplasmic-nuclear interface in Alzheimer's disease. *Journal of Neurocytology*, 17(6), 827–833. <https://doi.org/10.1007/BF01216709>
- Mirbaha, H., Chen, D., Morazova, O. A., Ruff, K. M., Sharma, A. M., Liu, X., ... Diamond, M. I. (2018a). Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>
- Mirbaha, H., Chen, D., Morazova, O. A., Ruff, K. M., Sharma, A. M., Liu, X., ... Diamond, M. I. (2018b). Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>
- Mirbaha, H., Holmes, B. B., Sanders, D. W., Bieschke, J., & Diamond, M. I. (2015). Tau trimers are the minimal propagation unit spontaneously internalized to seed intracellular aggregation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652693>
- Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., & Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 32040–32053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., ... Arendash, G. W. (2000). A  $\beta$  peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35050116>
- Mori, H., Kondo, J., & Ihara, Y. (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4796), 1641–1644. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3029875>
- Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Alavi Naini, S. M., ... Brion, J. P. (2017). What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta*



*Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0488-7>

- Mukrasch, M. D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., ... Zweckstetter, M. (2009). Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution. *PLoS Biology*, 7(2), e1000034. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>
- Mukrasch, M. D., Biernat, J., von Bergen, M., Griesinger, C., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2005). Sites of Tau Important for Aggregation Populate  $\beta$ -Structure and Bind to Microtubules and Polyanions. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24978–24986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501565200>
- Nacharaju, P., Lewis, J., Easson, C., Yen, S., Hackett, J., Hutton, M., & Yen, S. H. (1999). Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00294-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00294-X)
- Narasimhan, S., Guo, J. L., Changolkar, L., Stieber, A., McBride, J. D., Silva, L. V., ... Lee, V. M. Y. (2017). Pathological tau strains from human brains recapitulate the diversity of tauopathies in non-transgenic mouse brain. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1230-17.2017>
- Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., ... Beach, T. G. (2012). Correlation of alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., & Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Research*, 387(3), 271–280. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3103857>
- Nicoll, J. A. R., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H., & Weller, R. O. (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- $\beta$  peptide: a case report. *Nature Medicine*, 9(4), 448–452. <https://doi.org/10.1038/nm840>
- Nisbet, R. M., Van der Jeugd, A., Leinenga, G., Evans, H. T., Janowicz, P. W., & Götz, J. (2017). Combined effects of scanning ultrasound and a tau-specific single chain antibody in a tau transgenic mouse model. *Brain*, 140(5), 1220–1230. <https://doi.org/10.1093/brain/awx052>
- Nisbet, R. M., Van Der Jeugd, A., Leinenga, G., Evans, H. T., Janowicz, P. W., & Götz, J. (2017). Combined effects of scanning ultrasound and a tau-specific single chain antibody in a tau transgenic mouse

- model. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awx052>
- Nishimura, I., Yang, Y., & Lu, B. (2004). PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00170-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00170-9)
- Novak, P., Schmidt, R., Kontseikova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Skrabana, R., ... Novak, M. (2017). Safety and immunogenicity of the tau vaccine AADvac1 in patients with Alzheimer's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet Neurology*. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30331-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30331-3)
- O'Meara, E. S., Kukull, W. A., Schellenberg, G. D., Bowen, J. D., McCormick, W. C., Teri, L., ... Larson, E. B. (1997). Alzheimer's Disease and History of Blood Transfusion by Apolipoprotein-E Genotype. *Neuroepidemiology*, 16(2), 86–93. <https://doi.org/10.1159/000109675>
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J. P., Cribbs, D. H., & LaFerla, F. M. (2004). A $\beta$  immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.003>
- Orgogozo, J.-M., Gilman, S., Dartigues, J.-F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L. C., ... Hock, C. (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*, 61(1), 46–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12847155>
- Pandya, S., Mezas, C., & Raj, A. (2017). Predictive model of spread of progressive supranuclear palsy using directional network diffusion. *Frontiers in Neurology*. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00692>
- Panza, F., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., & Logroscino, G. (2014). Amyloid-directed monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease: the point of no return? *Expert Opinion on Biological Therapy*. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.935332>
- Panza, F., Solfrizzi, V., Seripa, D., Imbimbo, B. P., Lozupone, M., Santamato, A., ... Logroscino, G. (2016). Tau-based therapeutics for Alzheimer's disease: Active and passive immunotherapy. *Immunotherapy*. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0019>
- Peeraer, E., Bottelbergs, A., Van Kolen, K., Stancu, I. C., Vasconcelos, B., Mahieu, M., ... Moechars, D. (2015). Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiology of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.032>
- Pérez, M., Hernández, F., Lim, F., Díaz-Nido, J., & Avila, J. (2003). Chronic lithium treatment decreases

- mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 5(4), 301–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624025>
- Perez, M., Santa-Maria, I., De Barreda, E. G., Zhu, X., Cuadros, R., Cabrero, J. R., ... Avila, J. (2009). Tau - An inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *Journal of Neurochemistry*, 109(6), 1756–1766. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x>
- Planel, E., Miyasaka, T., Launey, T., Chui, D.-H., Tanemura, K., Sato, S., ... Takashima, A. (2004). Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities: Implications for Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 24(10), 2401–2411. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5561-03.2004>
- Plouffe, V., Mohamed, N. V., Rivest-McGraw, J., Bertrand, J., Lauzon, M., & Leclerc, N. (2012). Hyperphosphorylation and Cleavage at D421 Enhance Tau Secretion. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036873>
- Polanco, J. C., Scicluna, B. J., Hill, A. F., & Götz, J. (2016). Extracellular vesicles isolated from the brains of rTg4510 mice seed tau protein aggregation in a threshold-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709485>
- Pooler, A. M., Polydoro, M., Wegmann, S., Nicholls, S. B., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2013). Propagation of tau pathology in Alzheimer's disease: Identification of novel therapeutic targets. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/alzrt214>
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4542), 136–144. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801762>
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13363–13383. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811807>
- Qu, B. X., Gong, Y., Moore, C., Fu, M., German, D. C., Chang, L. Y., ... Diaz-Arrastia, R. (2014). Beta-amyloid auto-antibodies are reduced in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.06.017>
- Raina, A. K., Hochman, A., Ickes, H., Zhu, X., Ogawa, O., Cash, A. D., ... Smith, M. A. (2003). Apoptotic promoters and inhibitors in Alzheimer's disease: Who wins out? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(2), 251–254. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00020-4)
- Rajamohamedsait, H., Rasool, S., Rajamohamedsait, W., Lin, Y., & Sigurdsson, E. M. (2017).

- Prophylactic Active Tau Immunization Leads to Sustained Reduction in Both Tau and Amyloid- $\beta$  Pathologies in 3xTg Mice. *Scientific Reports*, 7(1), 17034. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17313-1>
- Rametti, A., Esclaire, F., Yardin, C., & Terro, F. (2004). Linking Alterations in Tau Phosphorylation and Cleavage during Neuronal Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54518–54528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408186200>
- Regan, P., Piers, T., Yi, J.-H., Kim, D.-H., Huh, S., Park, S. J., ... Cho, K. (2015). Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(12), 4804–4812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015>
- Robakis, N. K., Wisniewski, H. M., Jenkins, E. C., Devine-Gage, E. A., Houck, G. E., Yao, X. L., ... Ted Brown, W. (1987). CHROMOSOME 21q21 SUBLOCALISATION OF GENE ENCODING BETA-AMYLOID PEPTIDE IN CEREBRAL VESSELS AND NEURITIC (SENILE) PLAQUES OF PEOPLE WITH ALZHEIMER DISEASE AND DOWN SYNDROME. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)91754-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)91754-5)
- Rosenmann, H., Grigoriadis, N., Karussis, D., Boimel, M., Touloumi, O., Ovadia, H., & Abramsky, O. (2006). Tauopathy-like abnormalities and neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. *Archives of Neurology*. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1459>
- Rozenstein-Tsalkovich, L., Grigoriadis, N., Lourbopoulos, A., Nousiopoulou, E., Kassis, I., Abramsky, O., ... Rosenmann, H. (2013). Repeated immunization of mice with phosphorylated-tau peptides causes neuroinflammation. *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.07.006>
- Rüb, U., Stratmann, K., Heinsen, H., Seidel, K., Bouzrou, M., & Korf, H. W. (2017). Alzheimer's Disease: Characterization of the Brain Sites of the Initial Tau Cytoskeletal Pathology Will Improve the Success of Novel Immunological Anti-Tau Treatment Approaches. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-161102>
- Run, X., Liang, Z., Zhang, L., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., & Gong, C.-X. (2009). Anesthesia Induces Phosphorylation of Tau. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16(3), 619–626. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1003>
- Sadasivam Jeganathan, ‡,§, Martin von Bergen, \*, ‡,§, Henrik Brutlach, ||, Heinz-Jürgen Steinhoff, || and, & Eckhard Mandelkow\*, ‡. (2006). Global Hairpin Folding of Tau in Solution†.

<https://doi.org/10.1021/BI0521543>

- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., ... Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP<sup>Sc</sup> molecules with different conformations. *Nature Medicine*, 4(10), 1157–1165. <https://doi.org/10.1038/2654>
- Saito, Y., Ruberu, N. N., Sawabe, M., Arai, T., Tanaka, N., Kakuta, Y., ... Murayama, S. (2004). Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(9), 911–918. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15453090>
- Sanders, D. W., Kaufman, S. K., DeVos, S. L., Sharma, A. M., Mirbaha, H., Li, A., ... Diamond, M. I. (2014). Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>
- Sankaranarayanan, S., Barten, D. M., Vana, L., Devidze, N., Yang, L., Cadelina, G., ... Ahljianian, M. (2015). Passive Immunization with Phospho-Tau Antibodies Reduces Tau Pathology and Functional Deficits in Two Distinct Mouse Tauopathy Models. *PLOS ONE*, 10(5), e0125614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125614>
- Santa-Maria, I., Varghese, M., Książak-Reding, H., Dzhun, A., Wang, J., & Pasinetti, G. M. (2012). Paired helical filaments from Alzheimer disease brain induce intracellular accumulation of tau protein in aggresomes. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323279>
- Santpere, G., & Ferrer, I. (2009). Delineation of early changes in cases with progressive supranuclear palsy-like pathology. Astrocytes in striatum are primary targets of tau phosphorylation and GFAP oxidation. *Brain Pathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00173.x>
- Saper, C. B., Wainer, B. H., & German, D. C. (1987). Axonal and transneuronal transport in the transmission of neurological disease: Potential role in system degenerations, including alzheimer's disease. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90063-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90063-7)
- Sato, C., Barthélemy, N. R., Mawuenyega, K. G., Patterson, B. W., Gordon, B. A., Jockel-Balsarotti, J., ... Bateman, R. J. (2018). Tau Kinetics in Neurons and the Human Central Nervous System. *Neuron*, 97(6), 1284–1298.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.015>
- Sayas, C. L., Avila, J., & Wandosell, F. (2002). Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1582(1–3), 144–153. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069822>
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guldo, T., ... Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse.

*Nature*. <https://doi.org/10.1038/22124>

- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J. P., Hamdane, M., & Buée, 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. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060002>
- Schroeder, S., Joly-Amado, A., Soliman, A., Sengupta, U., Kaye, R., Gordon, M. N., & Morgan, D. (2017). Oligomeric tau-targeted immunotherapy in Tg4510 mice. *Alzheimer's Research & Therapy*, *9*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0274-6>
- Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., & Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(39), 24290–24297. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929085>
- Selenica, M.-L. B., Davtayan, H., Housley, S. B., Blair, L. J., Gillies, A., Nordhues, B. A., ... Dickey, C. A. (2014). Epitope analysis following active immunization with tau proteins reveals immunogens implicated in tau pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation*, *11*(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0152-0>
- Sengupta, U., Portelius, E., Hansson, O., Farmer, K., Castillo-Carranza, D., Woltjer, R., ... Kaye, R. (2017). Tau oligomers in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *4*(4), 226–235. <https://doi.org/10.1002/acn3.382>
- Senior, K. (2002). Dosing in phase II trial of Alzheimer's vaccine suspended. *The Lancet. Neurology*, *1*(1), 3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12849527>
- Sergeant, N., David, J. P., Lefranc, D., Vermersch, P., Wattez, A., & Delacourte, A. (1997). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Letters*, *412*(3), 578–582. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276470>
- Sergeant, N., Wattez, A., & Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: Tau pathologies with exclusively "Exon 10" isoforms. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0721243.x>
- Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., ... Hisanaga, S. -i. (2012). Regulation of Mitochondrial Transport and Inter-Microtubule Spacing by Tau Phosphorylation at the Sites Hyperphosphorylated in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *32*(7), 2430–2441. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5927-11.2012>

- Shamir, D. B., Rosenqvist, N., Rasool, S., Pedersen, J. T., & Sigurdsson, E. M. (2016). Internalization of tau antibody and pathological tau protein detected with a flow cytometry multiplexing approach. *Alzheimer's and Dementia*. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.013>
- Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., ... St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/375754a0>
- Shirazi, S. K., & Wood, J. G. (1993). The protein tyrosine kinase, fyn, in Alzheimer's disease pathology. *NeuroReport*. <https://doi.org/10.1097/00001756-199304000-00024>
- Sigurdsson, E. M. (2016). Tau immunotherapy. In *Neurodegenerative Diseases*. <https://doi.org/10.1159/000440842>
- Sillen, A., Barbier, P., Landrieu, I., Lefebvre, S., Wieruszeski, J.-M., Leroy, A., ... Lippens, G. (2007). NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Undefined*. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/NMR-investigation-of-the-interaction-between-the-Sillen-Barbier/d7d916fa2371111f00d386daae1d2f90e992923a>
- Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., ... Hof, P. (2016). Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*, *6*(1), 6. <https://doi.org/10.3390/biom6010006>
- Snow, A. D., Wight, T. N., Nochlin, D., Koike, Y., Kimata, K., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1990). Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.10.015>
- Spencer, B., Brüscheiler, S., Sealey-Cardona, M., Rockenstein, E., Adame, A., Florio, J., ... Masliah, E. (2018). Selective targeting of 3 repeat Tau with brain penetrating single chain antibodies for the treatment of neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathologica*, *136*(1), 69–87. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1869-0>
- St. George-Hyslop, P. H., Tanzi, R. E., Polinsky, R. J., Haines, J. L., Nee, L., Watkins, P. C., ... Gusella, J. F. (1987). The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2880399>
- Stancu, I. C., Vasconcelos, B., Ris, L., Wang, P., Villers, A., Peeraer, E., ... Dewachter, I. (2015). Templated

- misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1413-4>
- Steiner, B., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H. E., Schmidt, B., ... Mandelkow, E. (1990). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *The EMBO Journal*, 9(11), 3539–3544. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2120043>
- Strittmatter, W. J. (2012). Old drug, new hope for Alzheimer's disease. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1220725>
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., & Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1977>
- Subramanian, S., Savanur, G., & Madhavadas, S. (2017). Passive immunization targeting the N-terminal region of phosphorylated tau (residues 68–71) improves spatial memory in okadaic acid induced tauopathy model rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 585–589. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.101>
- Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., ... Galas, M.-C. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4566–4575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>
- T. Chris Gamblin, Robert W. Berry, and, & Binder\*, L. I. (2003). Tau Polymerization: Role of the Amino Terminus†. <https://doi.org/10.1021/BI0272510>
- Takeda, S., Commins, C., DeVos, S. L., Nobuhara, C. K., Wegmann, S., Roe, A. D., ... Hyman, B. T. (2016). Seed-competent high-molecular-weight tau species accumulates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease mouse model and human patients. *Annals of Neurology*. <https://doi.org/10.1002/ana.24716>
- Tanimukai, H., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 166(6), 1761–1771. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62486-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62486-8)
- Tardivel, M., Bégard, S., Bousset, L., Dujardin, S., Coens, A., Melki, R., ... Colin, M. (2016). Tunneling



- nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., ... Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5295), 2079–2082. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8953038>
- Terwel, D., Lasrado, R., Snauwaert, J., Vandeweert, E., Van Haesendonck, C., Borghgraef, P., & Van Leuven, F. (2005). Changed conformation of mutant tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of tau-4R/2N transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409876200>
- Theunis, C., Crespo-Biel, N., Gafner, V., Pihlgren, M., López-Deber, M. P., Reis, P., ... Muhs, A. (2013). Efficacy and safety of a liposome-based vaccine against protein Tau, assessed in tau.P301L mice that model tauopathy. *PloS One*, 8(8), e72301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072301>
- Tiwari, S. S., d'Orange, M., Troakes, C., Shurovi, B. N., Engmann, O., Noble, W., ... Giese, K. P. (2015). Evidence that the presynaptic vesicle protein CSPalpha is a key player in synaptic degeneration and protection in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0096-z>
- Togo, T., Sahara, N., Yen, S. H., Cookson, N., Ishizawa, T., Hutton, M., ... Dickson, D. W. (2002). Argyrophilic grain disease is a sporadic 4-repeat tauopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.6.547>
- Tolnay, M., & Braak, H. (2011). Argyrophilic Grain Disease. In *Neurodegeneration: The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders: Second Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781444341256.ch17>
- Tsuboi, Y., Doh-Ura, K., & Yamada, T. (2009). Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: Clinical trial against prion diseases: Symposium: Prion diseases - Updated. In *Neuropathology*. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2009.01058.x>
- Uchihara, T. (2007). Silver diagnosis in neuropathology: Principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0200-2>
- Umeda, T., Eguchi, H., Kunori, Y., Matsumoto, Y., Taniguchi, T., Mori, H., & Tomiyama, T. (2015). Passive immunotherapy of tauopathy targeting pSer413-tau: a pilot study in mice. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(3), 241–255. <https://doi.org/10.1002/acn3.171>

- Vandenberghe, R., Rinne, J. O., Boada, M., Katayama, S., Scheltens, P., Vellas, B., ... Black, R. S. (2016). Bapineuzumab for mild to moderate Alzheimer's disease in two global, randomized, phase 3 trials. *Alzheimer's Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0189-7>
- Vandermeeren, M., Borgers, M., Van Kolen, K., Theunis, C., Vasconcelos, B., Bottelbergs, A., ... Mercken, M. H. (2018). Anti-tau monoclonal antibodies derived from soluble and filamentous tau show diverse functional properties in vitro and in vivo. *Journal of Alzheimer's Disease*. <https://doi.org/10.3233/JAD-180404>
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., ... Galas, M.-C. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 84. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>
- Von Bergen, M., Barghorn, S., Li, L., Marx, A., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (2001). Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local  $\beta$ -Structure. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105196200>
- von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming beta structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5129>
- Wadsworth, J. D. F., & Collinge, J. (2007). Update on human prion disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(6), 598–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.010>
- Walls, K. C., Ager, R. R., Vasilevko, V., Cheng, D., Medeiros, R., & LaFerla, F. M. (2014). p-Tau immunotherapy reduces soluble and insoluble tau in aged 3xTg-AD mice. *Neuroscience Letters*, 575, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.05.047>
- Wang, H.-H., Li, H.-L., Liu, R., Zhang, Y., Liao, K., Wang, Q., ... Liu, S.-J. (2010). Tau Overexpression Inhibits Cell Apoptosis with the Mechanisms Involving Multiple Viability-Related Factors. *Journal of Alzheimer's Disease*, 21(1), 167–179. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091279>
- Wang, J.-Z., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2007). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European Journal of Neuroscience*, 25(1), 59–68. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x>

- Wang, J.-Z., Xia, Y.-Y., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2012). Abnormal Hyperphosphorylation of Tau: Sites, Regulation, and Molecular Mechanism of Neurofibrillary Degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(s1), S123–S139. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129031>
- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (1996). Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0896-871>
- Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., ... Mandelkow, E. M. (2017). The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Molecular Neurodegeneration*. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>
- Wang, Y. P., Biernat, J., Pickhardt, M., Mandelkow, E., & Mandelkow, E.-M. (2007). Stepwise proteolysis liberates tau fragments that nucleate the Alzheimer-like aggregation of full-length tau in a neuronal cell model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10252–10257. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703676104>
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858–1862. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1057175>
- West, T., Hu, Y., Verghese, P. B., Bateman, R. J., Braunstein, J. B., Fogelman, I., ... Holtzman, D. M. (2017). Preclinical and Clinical Development of ABBV-8E12, a Humanized Anti-Tau Antibody, for Treatment of Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *J Prev Alz Dis*. <https://doi.org/10.14283/jpad.2017.36>
- Wilcock, D. M., Alamed, J., Gottschall, P. E., Grimm, J., Rosenthal, A., Pons, J., ... Morgan, D. (2006). Deglycosylated Anti-Amyloid-beta Antibodies Eliminate Cognitive Deficits and Reduce Parenchymal Amyloid with Minimal Vascular Consequences in Aged Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*, 26(20), 5340–5346. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0695-06.2006>
- Woerman, A. L., Aoyagi, A., Patel, S., Kazmi, S. A., Lobach, I., Grinberg, L. T., ... Prusiner, S. B. (2016). Tau prions from Alzheimer's disease and chronic traumatic encephalopathy patients propagate in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616344113>
- Wu, J. W., Herman, M., Liu, L., Simoes, S., Acker, C. M., Figueroa, H., ... Duff, K. E. (2013). Small misfolded tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely

- transported in neurons. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528>
- Wu, J. W., Hussaini, S. A., Bastille, I. M., Rodriguez, G. A., Mrejeru, A., Rilett, K., ... Duff, K. E. (2016). Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nature Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1038/nn.4328>
- Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H., ... Holtzman, D. M. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20131685>
- Yanamandra, K., Jiang, H., Mahan, T. E., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Diamond, M. I., & Holtzman, D. M. (2015). Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. <https://doi.org/10.1002/acn3.176>
- Yanamandra, K., Kfoury, N., Jiang, H., Mahan, T. E., Ma, S., Maloney, S. E., ... Holtzman, D. M. (2013a). Anti-Tau Antibodies that Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition In Vivo. *Neuron*, 80(2), 402–414.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.046>
- Yanamandra, K., Kfoury, N., Jiang, H., Mahan, T. E., Ma, S., Maloney, S. E., ... Holtzman, D. M. (2013b). Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding invitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.046>
- Yang, Y., Yang, X.-F., Wang, Y.-P., Tian, Q., Wang, X.-C., Li, H.-L., ... Wang, J.-Z. (2007). Inhibition of protein phosphatases induces transport deficits and axonopathy. *Journal of Neurochemistry*, 102(3), 878–886. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04603.x>
- Yao, X.-Q., Zhang, X.-X., Yin, Y.-Y., Liu, B., Luo, D.-J., Liu, D., ... Liu, G.-P. (2011). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates Tyr<sup>307</sup> phosphorylation of protein phosphatase-2A via protein tyrosine phosphatase 1B but not Src. *Biochemical Journal*, 437(2), 335–344.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20110347>
- Yetman, M. J., Lillehaug, S., Bjaalie, J. G., Leergaard, T. B., & Jankowsky, J. L. (2016). Transgene expression in the Nop-tTA driver line is not inherently restricted to the entorhinal cortex. *Brain Structure and Function*. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1040-9>
- Zheng-Fischhöfer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Illenberger, S., Godemann, R., & Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires

a paired-helical-filament-like conformation. *European Journal of Biochemistry*.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520542.x>