

Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Clément DANIS

Le 14 décembre 2018

**CARACTERISATION D'ANTICORPS A DOMAINE UNIQUE DIRIGES CONTRE LA
PROTEINE TAU**

JURY

Pr. Patrice GOUET	Rapporteur
Dr. Mireille DUMOULIN	Rapporteur
Pr. Emmanuel PLANEL	Examineur
Dr. Jean-Christophe RAIN	Examineur
Dr. Isabelle LANDRIEU	Directrice de thèse
Dr. Luc BUEE	Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux réalisés durant ma thèse : le Dr. Mireille Dumoulin et le Pr. Patrice Gouet en leur qualité de rapporteurs ainsi que le Pr. Emmanuel Planel et le Dr. Jean-Christophe Rain en leur qualité d'examineurs.

Je tiens à remercier chaleureusement mes directeurs de thèse, le Dr. Isabelle Landrieu et le Dr. Luc Buée pour m'avoir supervisé pendant ces trois années. Je tiens également à les remercier pour m'avoir fait confiance et m'avoir laissé beaucoup d'autonomie pour réaliser mes recherches ainsi que pour leur disponibilité tout au long de ces trois années. Plus particulièrement, je remercie le Dr. Isabelle Landrieu pour sa disponibilité, son soutien et ses conseils qui m'ont permis d'amener aussi loin ce projet. Je remercie également le Dr. Luc Buée pour sa disponibilité et son aide pendant ces trois années, ce qui n'est pas toujours facile quand on est directeur d'unité. Je tiens également à le remercier pour les moments d'humour quotidien pendant les brainstormings scientifiques, qui aident toujours à se détendre et à garder la pêche.

Je remercie le Dr. Morvane Colin et Dr. Xavier Hanouille pour leurs participations actives à ce projet. Plus particulièrement, je tiens à remercier le Dr. Morvane Colin pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour sa disponibilité, ses conseils et son aide pour réaliser les expériences cellulaires et dans les modèles de souris, domaines dans lesquels je n'avais pratiquement aucune compétence avant de commencer. Je tiens également à remercier le Dr. Xavier Hanouille pour ses conseils et ses remarques importantes tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier le Dr Jean-Christophe Rain et Alexis Arrial de Hybrigenics services, qui ont également contribué au démarrage de ce projet et avec qui j'ai pu collaborer de façon active durant ces trois années de thèse ce qui, je l'espère, aboutira bientôt à la publication de l'article auquel ils ont grandement participé.

Un ENORME merci au Dr. Elian Dupré, pour son aide et sa collaboration très importante dans ce projet, son soutien et les innombrables discussions scientifiques ou autres que nous avons eu pendant les deux années passées ensemble autour d'une cigarette (et/ou d'une bière). Son aide a été très précieuse pour mener à bien ce projet tout en gardant la pêche.

Je remercie également le Dr. François-Xavier Cantrelle, pour m'avoir formé à l'utilisation des spectromètres et à l'analyse des données. Je le remercie également pour les discussions passées à imaginer de nouvelles expériences et pour avoir eu la patience de m'aider quand je stressais tout seul devant le spectromètre de peur de faire une bêtise.

Je remercie aussi Emmanuelle Boll pour sa bonne humeur quotidienne et son humour lors des repas du midi qui permettent toujours de passer des bons moments.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe : les Dr. Robert Schneider, Caroline Smet-Nocca et Alessia Lasorsa ainsi que Hamida Merzougui et João Neves pour tous les bons moments passés au laboratoire mais également en terrasse autour d'une bière.

Merci également aux anciens membres de l'équipe, les Dr Isabelle Huvent, Clément Despres et Luisa Bessa pour m'avoir chaleureusement accueilli et pour les bons moments passés au laboratoire.

Je remercie tous les membres de l'équipe Cristallo pour leur bonne ambiance quotidienne au labo. Plus particulièrement, je remercie Zoé Lens pour son aide lors des premières expériences réalisées sur le Biacore.

Je remercie tous les membres de l'équipe « Alzheimer et Tauopathies » pour les bons moments passés ensemble et toutes les différentes aides qu'ils ont pu m'apporter au cours de ces trois années.

Un grand merci à l'ensemble des membres de la « Team Morvane » (Morvane Colin, Sophie Halliez, Thomas Bouillet, Sarah Lieger, Marie Albert, Romain Perbet et Elodie Leroux) pour les très bons moments passés dans l'équipe ainsi que pour toutes les réunions scientifiques que nous avons réalisées et qui ont permis de faire avancer ce projet. Je suis très heureux de continuer l'aventure encore un an avec eux.

Plus particulièrement, je remercie Sarah Lieger et Théo Boschetti pour m'avoir aidé à plusieurs reprises pour réaliser différentes expériences sur les modèles cellulaires et murins. Je les remercie également pour leur bonne humeur et leur humour quotidien au labo ainsi que pour les moments de franches rigolades passés ensemble.

Je remercie Caroline Evrard, Melissa Gilles, Kevin Carvalho, Marie Albert et Claire Schirmer pour leur accueil et pour les bons moments de détente passés autour d'une bière pour déstresser.

Un grand merci à Marie Albert, Raphaëlle Caillierez et Sabiha Eddarkaoui pour leur très grande contribution dans toutes les expériences réalisées dans les modèles de souris transgéniques, et pour m'avoir formé à certaines manipulations telles que l'immunohistochimie.

Je remercie chaleureusement Séverine Bégard pour la réalisation et la production des vecteurs lentiviraux essentiels à cette nouvelle étude dans les modèles de souris.

Je remercie Anne Loyens pour la réalisation des grilles de microscopie électronique ainsi que pour son aide dans l'analyse des échantillons.

Je remercie Meryem Tardivel et Antonino Bongiovanni pour m'avoir formé à l'utilisation du microscope confocal et à l'analyse des données de fluorescence.

Je remercie Nathalie Jouy de la plateforme de cytométrie pour son aide sur l'acquisition et l'analyse des cellules du modèle FRET.

Je remercie le Labex Distalz qui a financé ma thèse pendant ces trois années.

Je remercie également les Dr Anja Bockmann et François Penin ainsi que toute l'équipe « RMN du solide des protéines » qui m'ont accueilli pour mon stage de Master 2 à Lyon et qui m'ont encouragé à continuer mes études et réaliser une thèse.

Je tiens à remercier tous mes amis proches qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de ces trois ans.

Un très grand merci à ma compagne, Mégane Homa, qui m'a soutenu et supporté pendant ces derniers mois de thèse. Merci pour ses encouragements incessants, pour m'avoir aidé à avancer sur certaines expériences, pour avoir accepté de relire ma thèse et pour m'avoir aidé à réaliser les figures pour lesquelles je n'étais pas particulièrement à l'aise. Merci également à elle pour m'avoir motivé et soutenu dans les moments difficiles.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et surtout mes parents pour m'avoir toujours soutenu dans tous les choix que j'ai faits autant sur le plan professionnel que personnel. Je tiens à faire une petite dédicace particulière à ma mère, pour son amour et son soutien inconditionnel et sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui.

« Science sans conscience n'est que ruine de l'âme »
François Rabelais (1483-1553)

Résumé

Tau est une protéine neuronale intrinsèquement désordonnée. Sa principale fonction est de réguler la polymérisation de la tubuline et la formation des microtubules. La protéine Tau est d'autre part impliquée dans la maladie d'Alzheimer ainsi que dans d'autres maladies neurodégénératives communément appelées tauopathies. En conditions pathologiques, la protéine Tau est retrouvée sous forme agrégée en structures fibrillaires. Tau est le constituant majeur des filaments hélicoïdaux appariés retrouvés dans les dégénérescences neurofibrillaires observées dans les neurones et qui sont associées à ces maladies.

Diverses hypothèses ont été explorées pour comprendre la cause de l'agrégation de la protéine Tau telles que des mutations au sein du gène codant pour la protéine, des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou l'acétylation, des facteurs de nucléation pouvant favoriser son agrégation, ou encore l'identification des régions intrinsèques pro-agrégantes de la protéine. Plus récemment des résultats ont montré que la protéine Tau sous forme agrégée était capable de se propager dans les différentes régions du cerveau par différents mécanismes de transfert inter-neuronal et pourrait adopter un comportement de type prion.

Certaines approches immunothérapeutiques ont été proposées pour cibler la protéine Tau extracellulaire et intracellulaire et ainsi empêcher la formation des fibres pathologiques. Des études ont montré qu'il était possible, en utilisant des anticorps ciblant des épitopes spécifiques de Tau, de réduire la formation de fibres et d'améliorer les fonctions cognitives chez des modèles de souris développant une tauopathie.

Dans ce contexte, notre but est de développer et caractériser des anticorps à domaine unique dirigés contre différentes formes de protéines Tau, afin de mieux comprendre les mécanismes liés à son agrégation et à sa propagation dans un contexte pathologique, mais également comme outils pour explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les anticorps à domaine unique, également appelés VHHs (pour « variable heavy chain of the heavy chain only antibody ») sont constitués d'un domaine unique qui correspond à la chaîne variable lourde retrouvée dans les

immunoglobulines G de type 2 et 3 de la famille des *Camelidae*. De par leur petite taille, les VHHs échappent à certaines contraintes et peuvent être plus facilement utilisés dans des expériences *in vitro* et *in vivo*. Ils ont également été décrits comme étant capable de passer au travers de la barrière hématoencéphalique. Enfin, ils sont produits de manière peu coûteuse en système bactérien et peuvent être modifiés de manière recombinante pour en adapter les propriétés biochimiques.

Dans un premier temps, et en collaboration avec la société Hybrigenics services, des VHHs ciblant les différentes formes de Tau ont été obtenus par phage display à partir d'une banque naïve synthétique. Les épitopes ont été identifiés par résonance magnétique nucléaire et les paramètres d'affinité pour chaque interaction VHH-Tau ont été déterminés par résonance plasmonique de surface.

Dans un deuxième temps, des premiers tests d'agrégation de la protéine Tau ont été réalisés, dans le but d'évaluer l'effet des VHHs sur cette agrégation au regard de leur épitope et de leur affinité. L'un des VHHs, appelé E4-1 et ciblant les régions pro-agrégantes de Tau, est capable d'inhiber son agrégation *in vitro*. Toujours en collaboration avec Hybrigenics, le VHH E4-1 a été optimisé pour permettre son expression intracellulaire. Un mutant appelé VHH Z70 a été obtenu. Ce mutant a la particularité d'inhiber de façon plus importante l'agrégation de Tau *in vitro* mais il est également capable d'empêcher l'agrégation intracellulaire de Tau dans un modèle cellulaire de nucléation.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons démarré des études préliminaires dans un modèle de souris développant une pathologie Tau. Des expériences d'injection intra-crâniale et intrapéritonéale du VHH E4-1 ont été réalisées en vue de suivre le comportement du VHH au sein du cerveau de ces souris. Le VHH E4-1 est retrouvé internalisé dans les neurones du cortex et cette internalisation ne semble pas dépendre de la protéine Tau. Dans l'hippocampe, le VHH E4-1 n'est pas internalisé et est retrouvé de manière plus diffuse, suggérant une spécificité neuronale pour l'internalisation du VHH. Le VHH E4-1 n'est pas retrouvé au sein du cerveau après injection intrapéritonéale et ne semble donc pas capable de traverser la barrière hémato-encéphalique. Ces expériences nous ont permis de concevoir une nouvelle étude basée sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux, dans le but d'explorer le potentiel thérapeutique de ce VHH.

Abstract :

Tau is a neuronal protein playing a fundamental role in regulation of tubulin polymerization and microtubule stability. Beyond its major physiological activity, Tau is also involved in a group of diseases called tauopathies, including Alzheimer disease (AD). It is the principal component of the paired helical filaments, the aggregated form of Tau which constitutes the intracellular neurofibrillary tangles in AD.

Although the mechanisms leading to these pathological Tau species is not clearly understood, different molecular features have been identified as involved in the aggregation process including : specific mutations identified in frontotemporal dementia, post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation and truncations and the identification of the regions that compose the nuclei of Tau aggregation. Moreover, recent results showed that pathological Tau could propagate by an intracellular transfer between neurons and adopt a prion like character.

Tau immunotherapy seems to be an attractive strategy in tauopathies to bind to and to clear extracellular and/or intracellular pathological species of the Tau protein to slow disease progression. Indeed, by targeting different Tau epitopes immunotherapy studies showed a reduction of Tau pathology and cognitive deficit in different mouse models of tauopathy.

In this context, our goal is to develop and characterize VHH targeted against Tau. VHH are also called single domain antibodies. They are constituted of an unique domain which corresponds to the variable heavy chain from the Immunoglobulin G from *Camelidae*. Due to their small size (15 kDa), VHH can be used *in vitro* and *in vivo* assays. They are produced as recombinant proteins and can easily be modified or optimized for these specific uses.

To begin, in partnership with Hybrigenics services Company, we obtained VHHs against Tau from a synthetic library. The recognition site of these VHHs on Tau was determined using NMR chemical shift perturbation experiments using 2D spectra. Affinity parameters characterizing the interaction were evaluated using SPR.

Then, we screened the characterized VHHs to test their ability to inhibit the aggregation of Tau in an *in vitro* assay. Some of these VHHs, such as E4-1 which target the aggregation region of Tau, have shown a strong inhibition effect on its

aggregation *in vitro*. In collaboration with Hybrigenics services, we optimized the VHH E4-1 into a new mutant Z70 that are actively expressed in cells. Interestingly, the optimized mutant Z70 displays better KD and better inhibition of the Tau aggregation *in vitro* than VHH E4-1. And expression of VHH Z70 in a cellular model of Tau seeding decreased its fluorescence-reported aggregation.

Finally, we started preliminary studies in a mouse model of tauopathy. Intracranial injections of VHH E4-1 into the mice hippocampus lead to its diffuse localization in the hippocampus and its internalization into the cortex neurons, suggesting that the internalization is maybe specific to these neurons. Intraperitoneal injections showed that E4-1 is not localized in the mice brain and doesn't seem to be able to cross the blood brain barrier. We then decided to adopt a novel strategy to study the therapeutic potential of the VHH Z70.

Table des matières

Abréviations.....	13
Introduction.....	16
I. Tau : structure et fonctions	17
A. Tau : une protéine intrinsèquement désordonnée.....	17
i. Généralités sur les protéines intrinsèquement désordonnées.....	17
ii. Structure de la protéine Tau	18
B. Fonctions de la protéine Tau.....	24
i. Tau et le cytosquelette.....	24
ii. Tau : une protéine pléiotrope	25
II. Tau : une protéine impliquée dans les maladies neurodégénératives	27
A. La maladie d'Alzheimer : la principale tauopathie	27
i. Le peptide amyloïde β (A β) et les plaques séniles	28
ii. La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires (NFTs).....	29
iii. Quel est le lien entre Tau et A β dans la Maladie d'Alzheimer ?	31
B. Les tauopathies : caractéristiques générales	34
III. Tau et agrégation.....	36
A. Les inducteurs polyanioniques	37
B. Implication du domaine de liaison aux microtubules dans le processus d'agrégation de Tau.....	40
C. Mutations et agrégation de Tau.....	44
D. Modifications post-traductionnelles et agrégation de Tau.....	48
i. Tau et phosphorylation	48
ii. Tau et acétylation.....	50
iii. Tau et troncations	52
iv. Autres modifications post-traductionnelles de Tau.....	53
E. Les formes oligomériques : espèces pathologiques de Tau ?	54
F. Tau et l'hypothèse de sa propagation de type prion	55
i. La propagation intercellulaire de Tau	57
ii. Internalisation de Tau et phénomène de nucléation.....	58
IV. Les thérapies ciblant la protéine Tau	59
A. Les différentes stratégies thérapeutiques.....	60
i. Réduction de la phosphorylation de Tau	60
ii. Inhibition d'autres modifications post-traductionnelles.....	62

iii.	Inhibition de l'agrégation de Tau	63
iv.	Les autres stratégies thérapeutiques	63
B.	L'immunothérapie anti-Tau.....	63
V.	Les anticorps à domaine unique ou VHHs.....	66
A.	Origine des anticorps à domaine unique	66
B.	Structure et propriétés des VHHs.....	68
i.	Caractéristiques et différences structurales entre les domaines VH et VHH.....	68
ii.	Génération et sélection des VHHs.....	70
iii.	Propriétés biochimiques des VHHs	71
C.	Les VHHs : des outils pour l'étude des interactions protéiques.....	74
i.	Etude structurale par cristallographie aux rayons X	74
ii.	Etude des mécanismes d'agrégation des protéines.....	76
D.	Vers une utilisation diagnostique et thérapeutique des VHHs	81
i.	L'utilisation des VHHs en oncologie	81
ii.	Les VHHs dans les maladies neurodégénératives	83
	Objectifs de l'étude	87
	Résultats	90
I.	Caractérisation biochimique des interactions VHH-Tau	91
A.	Identification des épitopes de Tau reconnus par les VHHs.....	92
i.	Identification des épitopes de chaque VHH dirigé contre Tau 2N4R non modifiée par expérience de RMN 2D HSQC	92
ii.	Identification de l'épitope du VHH E5-1 dirigé contre Tau phosphorylée <i>in vitro</i> par de l'extrait de cerveau de rat	97
B.	Détermination des affinités VHHs/Tau.....	100
C.	Optimisation des VHHs.....	104
II.	Inhibition de l'agrégation de Tau par l'utilisation des VHHs	108
A.	E4-1, E6 et H3-2 inhibent l'agrégation de Tau <i>in vitro</i>	108
B.	Inhibition de l'agrégation de Tau par l'utilisation du mutant Z70 optimisé et dérivé du VHH E4-1.....	112
i.	Résumé de l'article :	112
ii.	Publication.....	114
C.	Vers une nouvelle optimisation du VHH Z70.....	154
III.	Etude préliminaire du VHH E4-1 et de sa version optimisée Z70 dans le modèle de souris THY-Tau30	156

A. E4-1 est internalisé par les neurones du cortex et est retrouvé de manière diffuse dans l'hippocampe	156
B. Le VHH E4-1 ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique	160
C. Injections de vecteurs lentiviraux codants pour le VHH Z70 dans le modèle de souris THY-Tau30	161
Conclusions et perspectives	162
Matériels et méthodes	172
A. Banque d'ADN plasmidique.....	173
B. Etude de l'expression intracellulaire des VHH dans la lignée cellulaire N2A	174
C. Etudes réalisées <i>in vivo</i> chez les souris THY-Tau30 et littermates	175
i. Injections intrapéritonéales du VHH E4-1 c-Myc	175
ii. Injections intra-crânielles	175
iii. Immunofluorescence.....	176
iv. Western-blot	177
Bibliographie.....	178
Publications	202
Formations/Communications.....	203
Annexes	204

Abréviations

3AT : 3-aminotriazole

AICD : « APP intracellular domain » pour domaine intracellulaire de l'APP

APP : « amyloid precursor protein » pour protéine précurseur de l'amyloïde

A β : peptide amyloïde β

BACE1 : « β -amyloid cleaving enzyme-1»

BHE : barrière hémato-encéphalique

CBD : « corticobasal degeneration » pour dégénérescence corticobasale

CBP : « CREB binding protein »

CDR : « Complementary Determining Region »

CEA : « carcino embryonic antigen »

CFP : « cyan fluorescent protein »

C-ter : domaine C-terminal

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DEER : « Double Electron–Electron Resonance Spectroscopy »

eA : exotoxine A

EGFR : « epidermal growth factor receptor »

ERK2 : « extracellular signal-regulated kinase 2 »

Fab : « fragment antigen binding »

Fc : fragment cristallisable

FR : « Framework »

FRET : « Forster Resonance Energy Transfer »

FTDP-17 : démence fronto-temporale avec parkinsonisme associée au chromosome 17

GAGs : Glycosaminoglycanes sulfatés

GFAP : « glial fibrillary acidic protein » pour protéine acide fibrillaire gliale

GFP : « green fluorescent protein »

GSK-3 : glycogène synthase kinase 3

HCAb : « heavy chain only antibody »

HSQC : « heteronuclear single quantum correlation »

IC : intra-crâniale

IDP : « intrinsically disordered protein » pour protéine intrinsèquement désordonnée

IDR : « intrinsically disordered region » pour région intrinsèquement désordonnée

IGF-1R : « insulin-like growth factor 1 receptor »

IgG : Immunoglobuline G

Ig-NAR : « Immunoglobulin New Antigen Receptor »

IP : intrapéritonéale

Kd : constante d'équilibre

kDa : kiloDalton

k_{off} : constante de dissociation

k_{on} : constante d'association

LCR : liquide céphalo-rachidien

MA : maladie d'Alzheimer

MAP : « microtubule-associated proteins » pour protéine associée aux microtubules

MAPK : « mitogen-activated protein kinase »

MPT : modification post-traductionnelle

MTBD : « microtubule binding domain » pour domaine de liaison aux microtubules

NFT : « neurofibrillary tangle » pour dégénérescence neurofibrillaire

N-ter : domaine N-terminal

PET : « *Positron-emission tomography* » pour tomographie par émission de positons

PHF : « paired helical filaments » pour filaments hélicoïdaux appariés

pI : point isoélectrique

PRD : « proline rich domain » pour domaine riche en prolines

PSP : paralysie supranucléaire progressive

RCPG : récepteur couplé à la protéine G
RMN : résonance magnétique nucléaire
RPE : résonance paramagnétique électronique
s : secondes
ScFv : « single-chain variable fragment »
SCK : « Single Cycle Kinetics »
SDS : sodium dodécyl sulfate
SF : « straight filaments » pour filaments ordonnés
SNC : système nerveux central
SPR : « surface plasmon resonance » pour résonance plasmonique de surface
Tau : « tubulin associated unit »
Tau-P : Tau phosphorylée *in vitro* par de l'extrait de cerveau de rat
ThT : thioflavine T
VH: « variable heavy chain »
VHH : « variable heavy chain of the heavy chain only antibody »
VL: « variable light chain »
WT : « wild-type »
YFP : « yellow fluorescent protein »

Introduction

I. Tau : structure et fonctions

A. Tau : une protéine intrinsèquement désordonnée

i. Généralités sur les protéines intrinsèquement désordonnées

Les protéines sont des macromolécules biologiques dont les fonctions essentielles maintiennent l'homéostasie générale dans chaque organisme du vivant. Pendant de nombreuses années, il a été admis que la fonction d'une protéine est directement liée à sa structure tridimensionnelle. En effet, une protéine est définie par sa séquence en acides aminés, qui détermine elle-même sa structure tridimensionnelle et de ce fait sa fonction (Figure 1). Ce paradigme structure-fonction est basé sur des études réalisées sur les structures tridimensionnelles de protéines hautement résolues (<https://www.rcsb.org/>), démontrant que la structure permet d'interpréter et de comprendre les mécanismes régissant sa fonction.

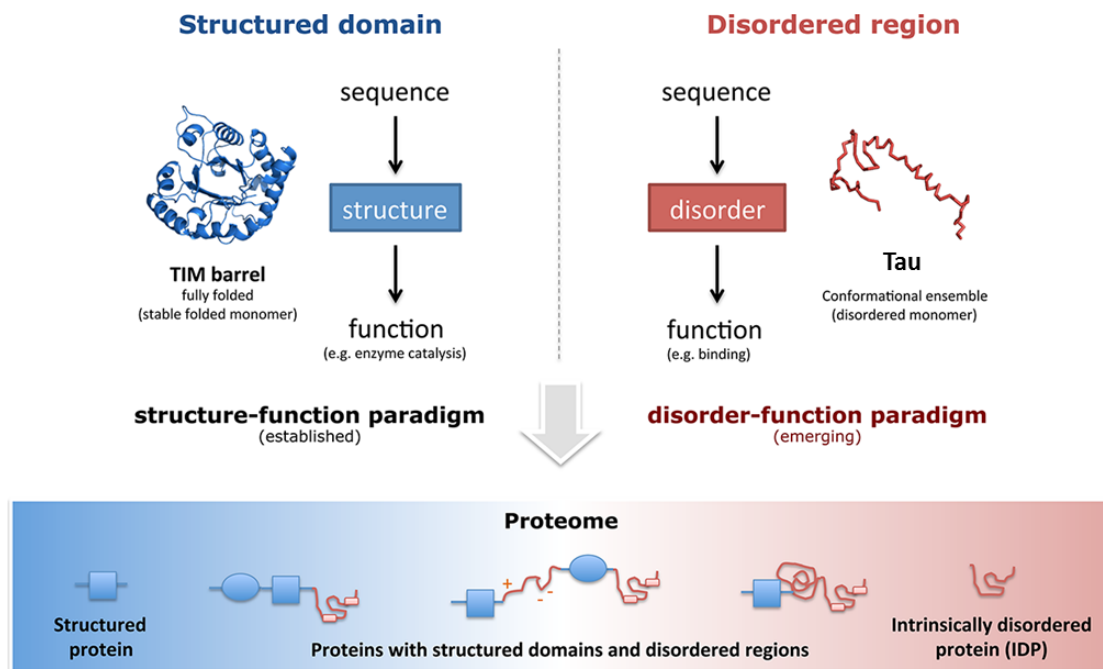


Figure 1 : Domaines structurés vs domaines intrinsèquement désordonnés. Le paradigme structure/fonction s'appuie sur l'hypothèse que la séquence d'une protéine définit sa structure et ainsi sa fonction biologique. A l'inverse, la séquence d'une protéine désordonnée ne définit pas de structure stable, la protéine peut être impliquée dans plusieurs fonctions biologiques. Figure adaptée de (van der Lee et al., 2014).

Néanmoins, ce paradigme est remis en cause puisque de nombreuses protéines contiennent des fragments qui ne possèdent pas de structure dites « stable » en solution (ou désordonnée). Des études de prédictions bio-informatiques ont estimé à 30 % le nombre de protéines eucaryotes contenant un segment désordonné supérieur à 50 résidus (Dunker et al., 2000). Certaines protéines adoptent même une conformation complètement désordonnée, telle que la protéine Tau qui fait l'objet de l'étude de ce manuscrit. Toutes les protéines intrinsèquement désordonnées (IDP) ou possédant des régions intrinsèquement désordonnées (IDR) partagent des propriétés uniques. En effet, leur structure primaire est généralement composée de :

- Un pourcentage faible de résidus hydrophobes (Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp et Tyr) qui forment habituellement le cœur d'une protéine globulaire.
- Un pourcentage élevé de résidus polaires et chargés (Gln, Ser, Pro, Asp, Glu, Lys) qui favorisent la flexibilité et la solubilité de ces protéines en solution (Dyson and Wright, 2005; Romero et al., 2001).

La propriété de désordre d'une protéine lui confère différents avantages fonctionnels, tels que la capacité à se fixer à divers partenaires, en adoptant différentes conformations (van der Lee et al., 2014). Ceci explique notamment pourquoi ces protéines sont généralement impliquées dans un grand nombre de processus de régulation biologique contrairement aux protéines dites structurées qui sont limitées dans leur nombre de fonctions.

Ce caractère multifonctionnel qui confère aux IDPs ces propriétés régulatrices, les associe également à un certain nombre de pathologies, en particulier les maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer (MA). Cette maladie est associée à la protéine Tau dont la structure et les fonctions seront décrites ci-après (Goedert et al., 2010).

ii. Structure de la protéine Tau

Organisation génomique

Tau, pour « tubulin associated unit », appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP) (Weingarten et al., 1975). La protéine Tau humaine est codée par le gène *mapt*, localisé sur le chromosome 17 (Neve et al., 1986). La transcription du gène aboutit à la formation d'un pré-ARNm contenant 16 exons.

Seulement 13 d'entre eux sont retrouvés dans le cerveau humain. Selon un processus d'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10, 6 isoformes de Tau sont produits dans le cerveau humain, dont l'isoforme 0N3R, qui est la seule isoforme produite au stade fœtal (Goedert and Jakes, 1990) (Figure 2a). L'isoforme 2N4R, constituée de 441 résidus, est généralement utilisée comme modèle pour représenter la structure de Tau. C'est cette isoforme qui a fait l'objet de la majorité des études présentées dans ce manuscrit, c'est pourquoi nous la présenterons comme exemple pour discuter des aspects structuraux et fonctionnels de Tau par la suite (Figure 2b).

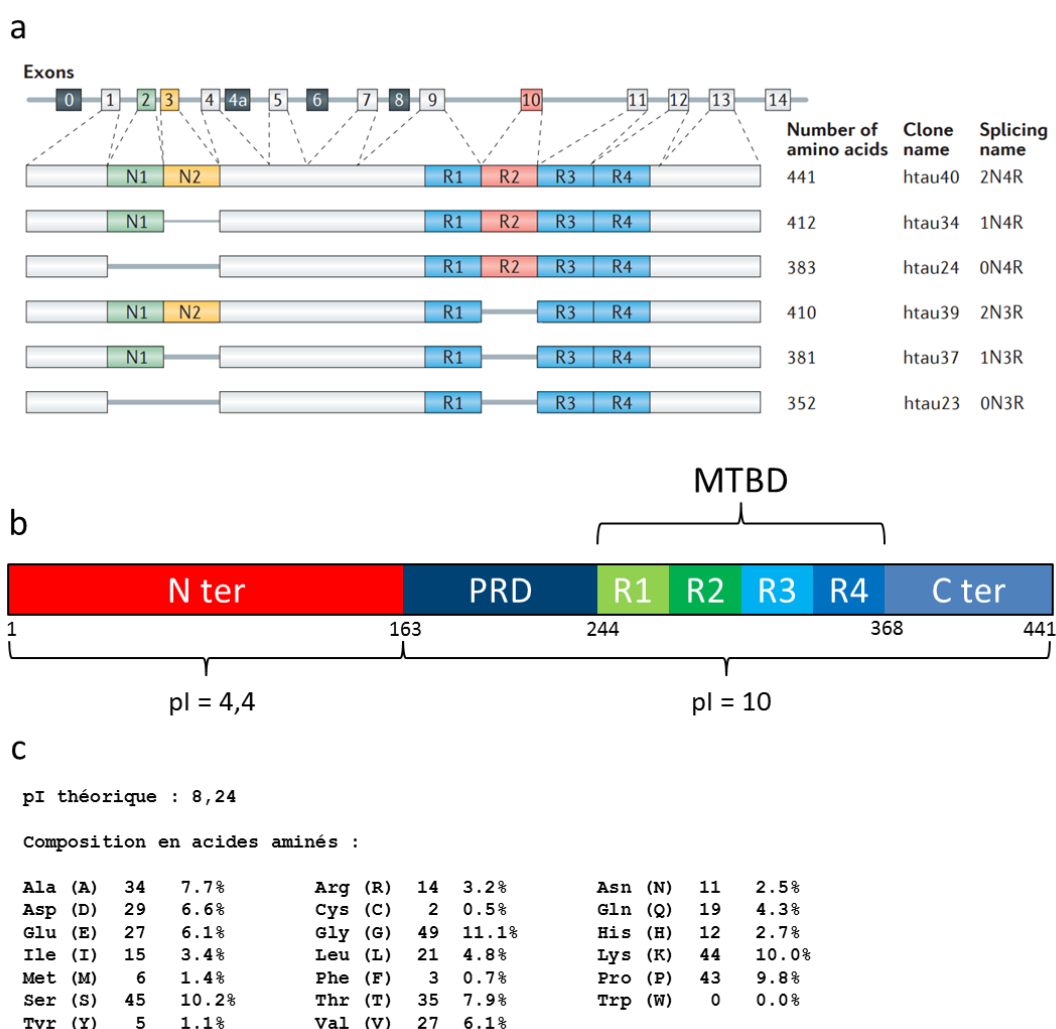


Figure 2 : a : Représentation schématique du gène *MAPT*, du transcrit primaire et des 6 isoformes générés par épissage alternatif de la protéine Tau (Wang and Mandelkow, 2016). b : Structure de la protéine Tau comprenant le domaine N-terminal (N-ter), le domaine riche en prolines (PRD), le domaine de liaison aux microtubules (MTBD) incluant les régions répétées R1, R2, R3 et R4 et enfin le domaine C-terminal (C-ter). Le point isoélectrique théorique des régions acides et basiques de la protéine est également indiqué. c : Point isoélectrique et composition en acides aminés de la protéine Tau.

Structure primaire

La protéine Tau peut être divisée en 4 domaines, comprenant le domaine N-terminal (N-ter), le domaine riche en prolines (PRD), le domaine de liaison aux microtubules (MTBD) constitué de 4 régions répétées R1, R2, R3 et R4 et enfin le domaine C-terminal (C-ter) (Figure 2b). Les régions répétées de Tau sont constitués de 18 résidus d'acides aminés fortement conservés et séparés par des séquences de jonction moins conservées. Tau contient une quantité importante de résidus polaires (Sérine : 45, Thréonine : 35) et de résidus hydrophiles chargés positivement (Lysine : 44, Arginine : 14) et négativement (Aspartate : 29, Glutamate : 27). Inversement, Tau contient très peu de résidus aliphatiques (Valine : 27, Isoleucine : 15, Leucine : 21) et hydrophobes (Phénylalanine : 3, et aucun Tryptophane) (Figure 2c). De plus, le pourcentage élevé de résidus chargés confère à la protéine un caractère basique très hydrophile avec un point isoélectrique théorique élevé ($pI = 8,2$). Les résidus chargés sont également répartis de façon catégorisée : le domaine N-ter est chargé négativement ($pI = 4$) alors que le PRD, le MTBD et le domaine C-ter sont chargés positivement ($pI = 10$) (Figure 2b). On parle donc d'un domaine acide et d'un domaine basique conférant à la protéine des propriétés de solubilité importante. Tous ces éléments concordent avec les attributs retrouvés chez une IDP (Dyson and Wright, 2005; Romero et al., 2001).

Tau : une IDP en solution...

Différentes techniques ont été utilisées pour mettre en évidence l'absence de structure secondaire ou tertiaire définie pour Tau, telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), le dichroïsme circulaire, la diffraction aux rayons X ainsi que différentes méthodes de fluorescence (Avila et al., 2016). Ici, nous allons illustrer par deux exemples la nature désordonnée de la protéine Tau.

Le caractère désordonné de la protéine Tau peut être étudié par analyse de la protéine sur SDS-PAGE. Cette méthode permet de séparer les protéines en fonction de leur taille, par migration sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (Laemmli, 1970). Une protéine structurée est habituellement observable grâce à sa masse moléculaire attendue, identifiable à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire (Figure 3a). Néanmoins, ce principe ne s'applique pas pour des protéines

comprenant des régions désordonnées. La protéine Tau non modifiée possède une masse moléculaire de 45 kiloDaltons (kDa). Cependant, la protéine est identifiée sur gel à une masse moléculaire apparente d'environ 60 kDa (Figure 3a). Du fait de leur composition différente en acides aminés, notamment au niveau des acides aminés chargés (Armstrong and Roman, 1993; Hu and Ghabrial, 1995), la quantité de SDS liée à une IDP serait moins importante que pour une protéine globulaire de même taille (Tompa, 2002). Ceci se traduit par une migration moins rapide et une masse moléculaire apparente plus élevée sur gel (Figure 3a).

La RMN est une technique de choix pour l'étude des interactions protéiques, mais elle permet également d'obtenir des informations sur la structure d'une protéine en solution. En effet, en utilisant une expérience RMN de base appelée HSQC 1H-15N à deux dimensions (2D), il est possible d'obtenir une cartographie de la protéine dans laquelle chaque fonction amide de la chaîne peptidique de chaque résidu est identifiée par une résonance (ou valeur de déplacement chimique), soit un point identifié sur le spectre (Figure 3b). La position des résonances sur le spectre est définie par l'environnement chimique dans lequel se trouvent les acides aminés constituant la protéine. Pour une protéine possédant une structure tertiaire stable telle qu'un anticorps à domaine unique, les résonances sur le spectre apparaissent dispersées car l'environnement de chaque résidu est relativement unique et influencé par la combinaison de structures primaire à tertiaire (Figure 3b). Pour la protéine Tau qui est une IDP, les résonances sont peu dispersées et se superposent. Cela traduit le fait que l'environnement de chaque résidu n'est pratiquement influencé que par la séquence (la nature des acides aminés voisins directs) en raison de l'absence de conformation structurale stable de ses résidus (Figure 3b) (Lippens et al., 2016).

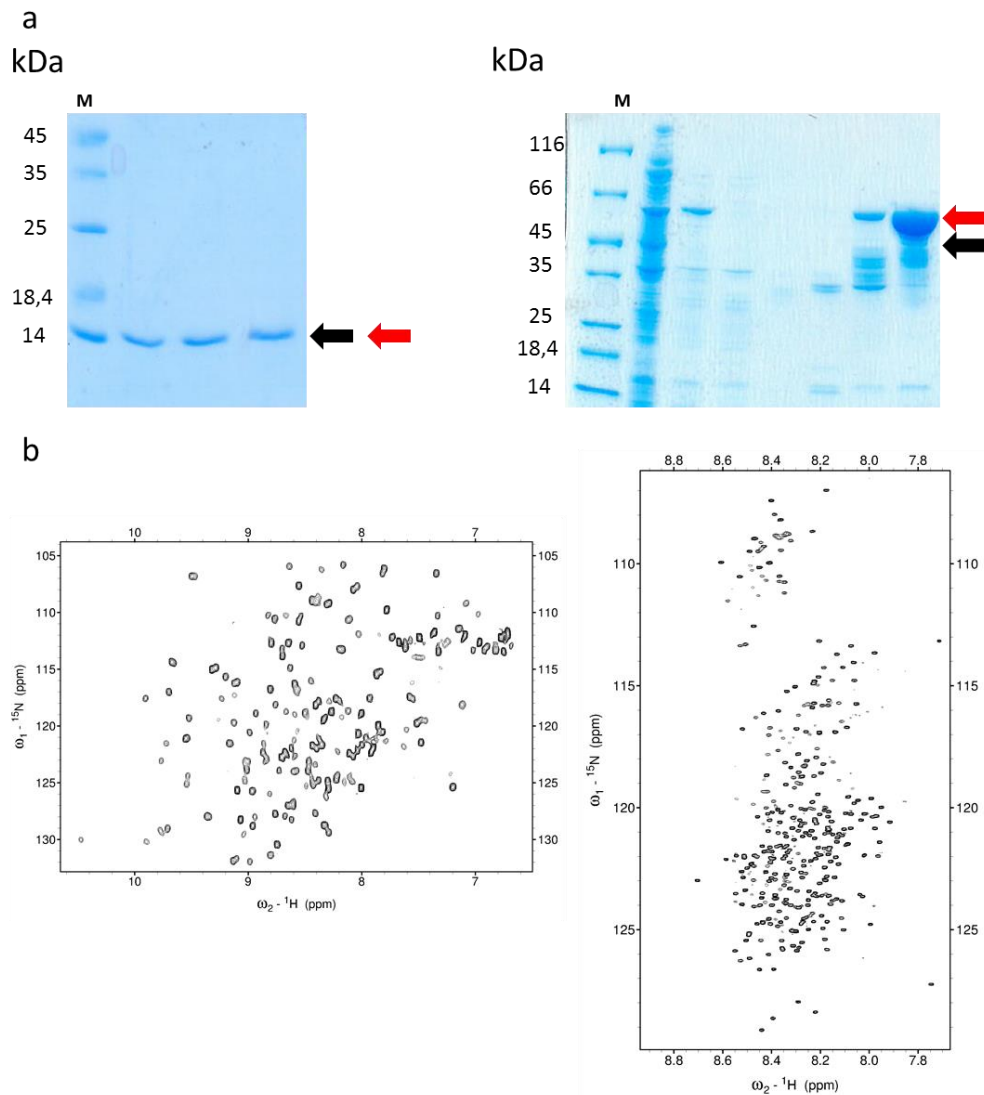


Figure 3 : a : Résultats en SDS-PAGE de la purification de deux protéines : le gel de gauche résulte de la purification d'un anticorps à domaine unique structuré de 14kDa. Le gel de droite résulte de la purification de la protéine Tau 2N4R de masse moléculaire théorique de 45kDa (flèches noires). L'anticorps à domaine unique est retrouvé à la taille attendue de 14 kDa contrairement à Tau, retrouvée à une masse moléculaire apparente de 60 kDa (flèches rouges). b : Spectres $^1\text{H} \ ^{15}\text{N}$ HSQC d'un anticorps à domaine unique (à gauche) et de la protéine Tau 2N4R (à droite). Les résonances ne sont dispersées en proton (axe x) que sur 1 ppm pour le spectre de Tau et sur plus de 3 ppm pour la protéine structurée.

...mais pas seulement

Bien que la protéine Tau ne comporte pas de structure dite stable en solution, certaines régions de la protéine peuvent former des structures secondaires locales transitoires. L'étude la plus approfondie sur les structures secondaires adoptées par Tau en solution a été réalisée par Mukrasch et ses collaborateurs. Ils ont montré que certains segments courts localisés au niveau du PRD et des domaines répétés du MTBD peuvent se présenter sous forme de brin β tandis que d'autres, localisés dans les domaines N-ter et C-ter, peuvent présenter une structure en hélice α (Mukrasch

et al., 2009). Ces petits motifs structuraux sont liés aux aspects fonctionnels de Tau et peuvent, par exemple, représenter des points d'ancrage pour des protéines partenaires de Tau. Nous avons vu que Tau se présente comme une protéine majoritairement désordonnée en solution et ne semble pas posséder de structure tertiaire (Figure 3d). Néanmoins, Tau peut présenter des conformations préférentielles, dynamiques, principalement dirigées par des interactions électrostatiques. Des études de FRET (Forster Resonance Energy Transfer) ont montré que Tau peut adopter une structure globale où son domaine C-ter se replie et interagit avec le MTBD (Figure 4). Le domaine N-ter se retrouve uniquement en interaction avec le domaine C-ter (Jeganathan et al., 2006).

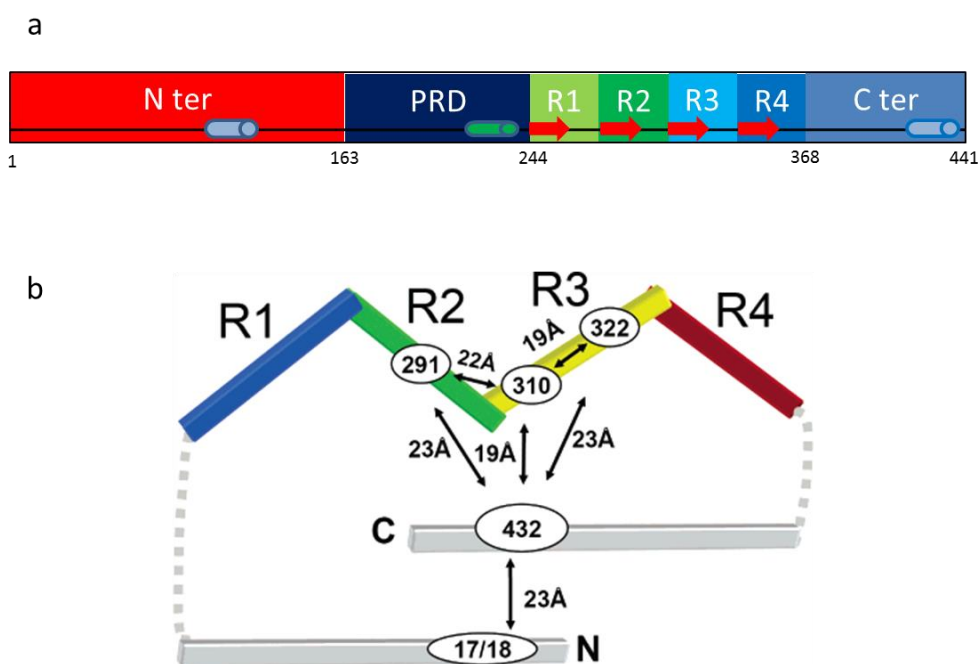


Figure 4 : a : Représentation de l'ensemble des structures secondaires que la protéine Tau 2N4R peut adopter en solution. Les hélices α sont représentées par les bâtonnets bleus. Les brins β sont représentés par les flèches rouges. L' hélice polyproline est représentée par le bâtonnet vert (Mukrasch et al., 2009). b : Modèle représentant les interactions inter domaines de la protéine Tau (Jeganathan et al., 2006).

Enfin, Tau adopte une conformation pathologique très stable dans les cas de maladies neurodégénératives, communément appelées tauopathies. En effet, Tau est retrouvée hyperphosphorylée sous forme de filaments hélicoïdaux appariés (PHF) (J.-P. Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986). Récemment, la structure d'un PHF provenant d'un cerveau de patient atteint de la MA a été résolu par cryo-

microscopie électronique et montre une organisation structurale très ordonnée en brin β (Fitzpatrick et al., 2017). Les pathologies en lien avec les différents aspects structuraux de la protéine Tau seront discutées plus longuement par la suite (cf Introduction, II, A : La maladie d'Alzheimer, ii : La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires, p29).

B. Fonctions de la protéine Tau

i. Tau et le cytosquelette

Tau est une protéine essentielle participant à la croissance, au transport et à la morphologie axonale des neurones. En effet, Tau joue un rôle majeur dans la régulation de la polymérisation de la tubuline et participe ainsi à l'assemblage des microtubules. Cette protéine a été historiquement découverte associée à la tubuline dans des extraits de cerveaux de porc et permet la polymérisation de la tubuline en microtubules *in vitro* (Weingarten et al., 1975).

De par son caractère désordonné, la protéine Tau est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs), la phosphorylation étant la plus importante (Hanger et al., 2009). La phosphorylation de Tau affecte la vitesse de polymérisation de la tubuline (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1995; Lindwall and Cole, 1984) en diminuant son affinité pour les microtubules et par conséquent leur stabilité (Drewes et al., 1995; Sengupta et al., 1998). La phosphorylation de Tau agirait également sur son propre transport axonal, notamment en modulant son affinité pour les kinésines (Cuchillo-Ibanez et al., 2008).

Le MTBD est directement impliqué dans la polymérisation de la tubuline, grâce aux régions répétées. Récemment, une structure de Tau associée aux microtubules a été résolue par cryo-microscopie électronique. Un modèle structural a été proposé dans lequel les 4 régions répétées interagissent en tandem au niveau de l'interface de chaque dimère de tubuline α - β , permettant ainsi l'association entre les dimères de tubuline (Kellogg et al., 2018). L'étude du complexe Tau-microtubule par RMN a permis d'identifier la région comprenant les résidus 214-372 comme site principal d'interaction de Tau avec les microtubules (Sillen et al., 2007). On retrouve une partie du PRD également impliqué dans la régulation de l'interaction entre le MTBD

et les microtubules (Goode et al., 1997). Des études ont également montré que Tau interagit avec l'actine via le MTBD et pourrait ainsi réguler la dynamique des réseaux de microtubules et d'actine au sein des cellules (Elie et al., 2015; Yu and Rasenick, 2006). Néanmoins, Tau n'est pas uniquement une protéine associée aux microtubules et présente de nombreuses fonctions.

ii. Tau : une protéine pléiotrope

De nombreuses études plus récentes ont mis en évidence de nouvelles fonctions de Tau impliquées dans un grand nombre de processus biologiques neuronaux. De même, Tau a été décrite comme une protéine majoritairement cytosolique et principalement localisée dans les axones. Ce concept est toutefois nuancé puisqu'on trouve un rôle important de Tau dans le noyau ainsi que dans le compartiment dendritique (Guo et al., 2017) (Figure 5).

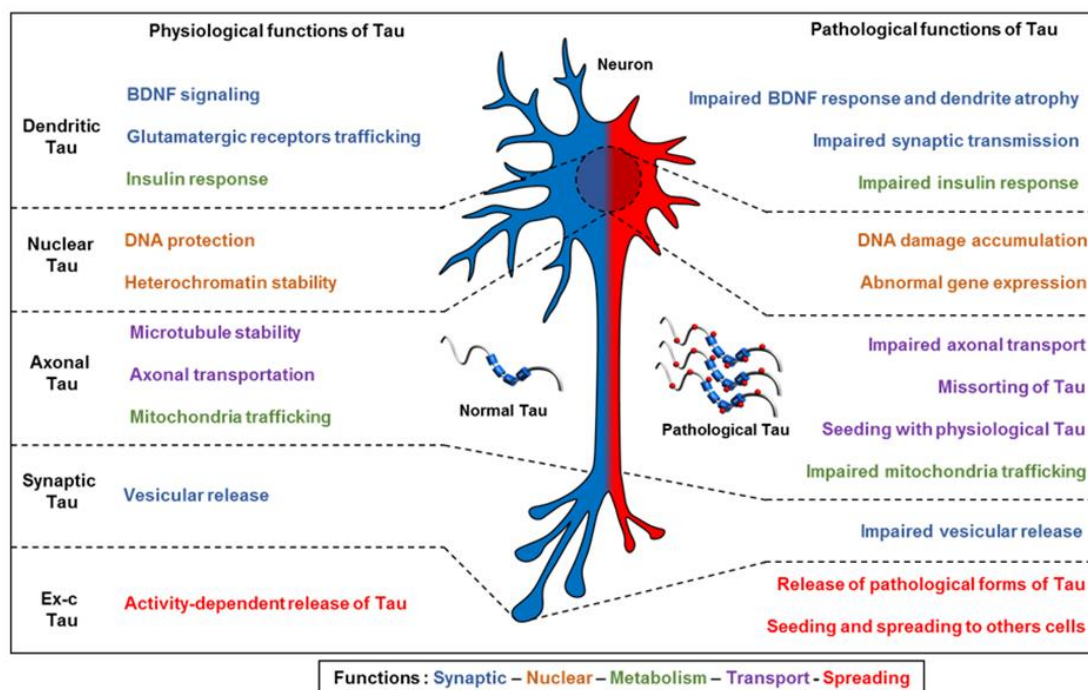


Figure 5 : Les fonctions physiologiques et pathologiques de Tau. En dehors de son rôle dans la stabilisation des microtubules dans le compartiment axonal, Tau est également retrouvée dans différents compartiments cellulaires, où elle exerce d'autres fonctions essentielles.

Tau : une protéine nucléaire

Depuis maintenant plus de 30 ans, la protéine Tau est connue pour être localisée dans le noyau (Loomis et al., 1990). Depuis, plusieurs rôles de cette Tau nucléaire ont été mis en évidence. Des études réalisées sur des cultures neuronales et des

modèles de souris déficientes en Tau (KO-Tau) ont montré que Tau joue un rôle majeur dans la protection des dommages à l'ARN et à l'ADN (Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014). En effet, Tau interagit avec l'ADN via les domaines PRD/MTBD (R2) et cette interaction est fortement réduite lorsque le PRD de Tau est phosphorylé (Qi et al., 2015). La phosphorylation de Tau pourrait ainsi réguler sa translocation entre le compartiment cytosolique et nucléaire.

Tau : une protéine synaptique

Tau est majoritairement distribuée dans les axones des neurones adultes. Toutefois, en conditions physiologiques, Tau est retrouvée sous forme phosphorylée dans le compartiment somato-dendritique des neurones (Tashiro et al., 1997). En conditions pathologiques, cela conduit à une déficience synaptique (Hoover et al., 2010) prouvant ainsi l'importance de Tau dans les fonctions synaptiques. Bien que ce rôle ne soit pas encore bien défini, différentes études ont montré que Tau et sa régulation par phosphorylation pourraient avoir un rôle crucial pour la plasticité synaptique et la mémoire (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012).

Tau : une protéine médiatrice du métabolisme

Des déficiences dans le métabolisme du glucose sont observées chez les patients atteints d'une tauopathie (Teune et al., 2010). En effet, des études récentes dans des modèles de souris ont montré que Tau est nécessaire à la réponse à l'insuline et au fonctionnement du métabolisme énergétique dans l'hippocampe (Marciniak et al., 2017). Tau est également impliqué dans le trafic, la dynamique et la dégradation des mitochondries (Kopeikina et al., 2011; Zempel and Mandelkow, 2015).

Pour résumer, Tau présente de nombreuses fonctions. Celles-ci diffèrent selon sa localisation subcellulaire. Toutefois, ses fonctions sont altérées dans des conditions pathologiques, et notamment dans les tauopathies.

II. Tau : une protéine impliquée dans les maladies neurodégénératives

Aujourd'hui, la maladie d'Alzheimer et les maladies neurodégénératives associées affectent plus de 46 millions de personnes à travers le monde et ce nombre devrait atteindre les 130 millions d'ici 2050 (Prince et al., 2016). La maladie d'Alzheimer est la tauopathie la plus fréquente. C'est une maladie à évolution lente qui peut se développer sur une quinzaine voire une vingtaine d'années entre les premiers symptômes et la mort du patient.

Outre ses fonctions physiologiques, nous allons voir que la protéine Tau est également impliquée dans la maladie d'Alzheimer (MA) et dans des maladies associées regroupées sous le terme de tauopathies. Dans cette partie seront présentées les différentes caractéristiques de ces pathologies et le lien étroit qu'elles entretiennent avec la protéine Tau.

A. La maladie d'Alzheimer : la principale tauopathie

C'est en 1906 que le psychiatre et neuropathologiste Aloïs Alzheimer décrit la maladie neurodégénérative du même nom : la maladie d'Alzheimer. L'examen psychiatrique d'une de ses patientes, Mme Augusta Deter âgée de 51 ans, révèle un fort déclin cognitif associé à des troubles comportementaux aboutissant à une perte d'autonomie. Suite au décès de sa patiente, le Dr Alzheimer procède à la dissection de son cerveau. A l'aide d'une méthode histologique de coloration argentique, il identifie alors 2 principales lésions : les plaques séniles au niveau extracellulaire et dégénérescences neurofibrillaires à l'intérieur des neurones (Hippius and Neundörfer, 2003). Il faudra attendre les années 1980 pour identifier les composants majeurs de ces lésions à savoir le peptide amyloïde β ($A\beta$) comme composant des plaques séniles et la protéine Tau comme composant des dégénérescences neurofibrillaires (J.-P. Brion et al., 1985; Glenner and Wong, 1984).

i. Le peptide amyloïde β ($A\beta$) et les plaques séniles

Le peptide $A\beta$ est un des deux composants majeurs caractéristique de la maladie d'Alzheimer. Ce peptide est composé de 40 à 42 acides aminés généré par un clivage protéolytique de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP). Le gène *app* codant pour la glycoprotéine transmembranaire APP est localisé sur le chromosome 21. (Rohan de Silva et al., 1997). La protéine APP est la cible de modifications post-traductionnelles. En effet, elle subit un processus de clivage protéolytique où deux voies différentes peuvent être empruntées en fonction de l'implication de certaines protéases (Figure 6). Ces clivages aboutissent à la formation de fragments ayant des fonctions physiologiques distinctes. La voie non amyloïdogénique fait intervenir l' α -sécrétase suivi de la γ -sécrétase et permet de générer les fragments $sAPP\alpha$, C83 et p3 (Parvathy et al., 1998). Le peptide $A\beta$ est quant à lui produit par la voie dite amyloïdogénique. Cette voie fait intervenir la β -sécrétase également appelée « β -amyloid cleaving enzyme-1 » (BACE1) et génère les fragments $sAPP\beta$ et C99. Le clivage du C99 par la γ -sécrétase aboutit à la formation du peptide $A\beta$ (Cai et al., 2001; Vassar et al., 1999).

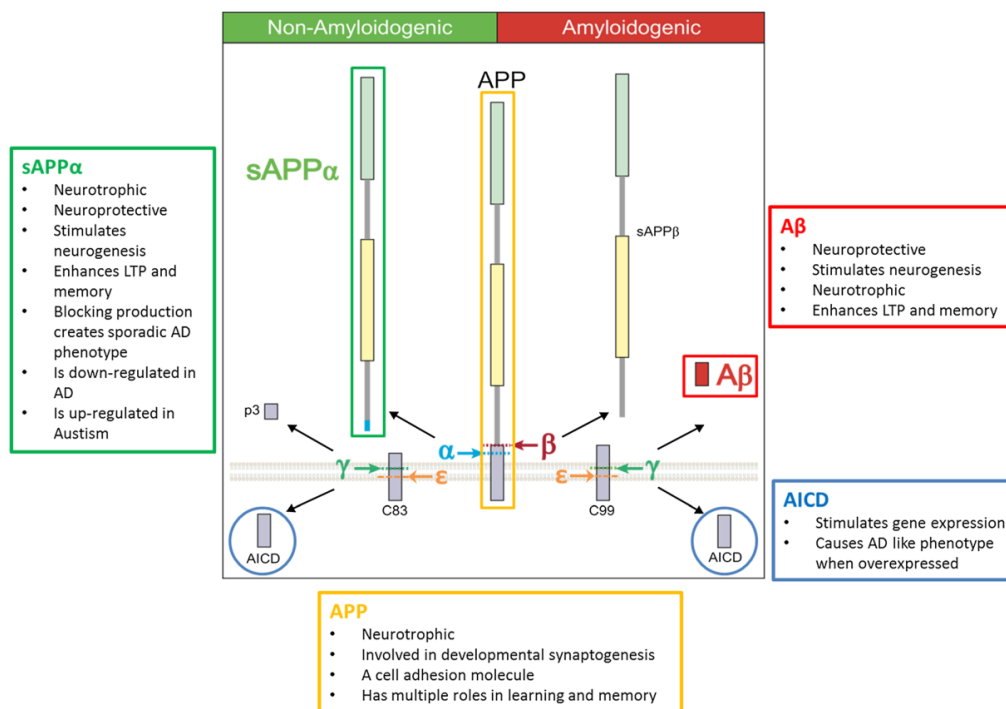


Figure 6 : Clivage physiologique de l'APP : mécanismes et fonctions. Présentation des deux voies permettant le clivage de l'APP : la voie amyloïdogénique et la voie non amyloïdogénique ainsi que les fonctions des fragments générés (Morris et al., 2014).

A ce jour, les fonctions biologiques de la protéine APP et de ses fragments restent encore mal définies. Cependant, certaines fonctions ont tout de même été décrites. La protéine APPs α aurait un rôle important dans le maintien de la plasticité synaptique, tandis que l'APP agirait comme une protéine d'adhésion cellulaire et aurait également différents rôles dans l'apprentissage et la mémoire. La protéine AICD pour « APP intracellular domain » est le produit intracellulaire du clivage de l'APP par la γ -secrétase. Cette protéine agit comme un facteur de transcription et pourrait réguler l'expression de nombreux gènes (Figure 6) (Pearson and Peers, 2006).

En conditions physiologiques, l'activité enzymatique la plus importante est celle de l' α -secrétase et la voie non amyloïdogénique est préférentielle ce qui limite la formation du peptide A β . Cette production physiologique du peptide A β serait essentielle au bon fonctionnement neuronal (Figure 6) (Kamenetz et al., 2003; Plant et al., 2003). Néanmoins, la surproduction du peptide A β en conditions pathologiques se traduit par une accumulation extracellulaire de celui-ci, conduisant à une neuroinflammation et des dysfonctionnements synaptiques (Wang et al., 2012). L'accumulation d'A β aboutit à son agrégation et à la formation de plaques séniles (Figure 7a-b). Des résultats récents montrent que la situation est encore plus complexe avec la mise en évidence de nouveaux processus de clivage aboutissant à la formation de nouveaux produits cataboliques de l'APP, dont le rôle dans le développement de la pathologie reste à explorer (Andrew et al., 2016; Baranger et al., 2016).

ii. La protéine Tau et les dégénérescences neurofibrillaires (NFTs)

La première observation par microscopie électronique des amas protéiques constituant les dégénérescences neurofibrillaires (NFTs) au sein de neurones de patients atteints de la MA a été réalisée au début des années 1960 (Figure 7c). L'analyse de ces amas a permis d'identifier la présence d'agrégats fibrillaires, adoptant une organisation structurale particulière nommés alors « paired helical filaments » (PHFs) pour filaments hélicoïdaux appariés (Kidd, 1963). En 1985, Jean-Pierre Brion et ses collaborateurs ont identifié la protéine Tau comme constituant majeur de ces PHFs (J.-P. Brion et al., 1985) (Figure 7d).

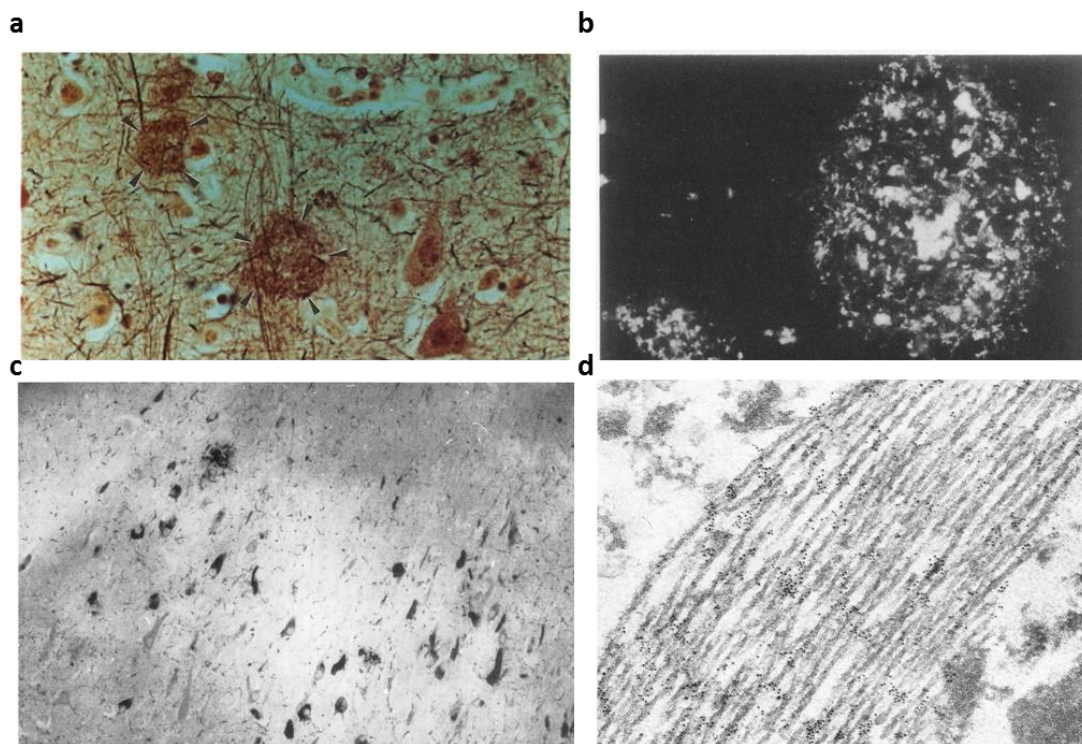


Figure 7 : Présentation des deux lésions histologiques qui caractérisent la maladie d'Alzheimer : les plaques séniles (a-b) constituées de peptides A β agrégés (Dickson et al., 1988) et les dégénérescences neurofibrillaires (c) constituées de protéines Tau sous forme de filaments hélicoïdaux appariés (d) (J. P. Brion et al., 1985).

La protéine Tau au sein des PHFs est également retrouvée sous une forme hyperphosphorylée et il est déjà suggéré, à cette époque, un lien entre la phosphorylation et l'agrégation de Tau (Alonso et al., 1997; Grundke-Iqbal et al., 1986). Néanmoins, la véritable structure de Tau composant les PHFs est restée inconnue pendant de nombreuses années. Les progrès en matière de technologies ont permis l'émergence de la cryo-microscopie électronique comme technique de choix pour étudier la structure atomique d'assemblage macromoléculaire. En 2017, la première structure de PHF provenant de fibres de Tau isolées à partir d'un cerveau de patient atteint de la MA a été résolue grâce à cette technique (Figure 8a-b) (Fitzpatrick et al., 2017). On retrouve dans cette structure principalement les sous-domaines R3, R4 et une partie du domaine C-ter (V306-F378) (Figure 8c) composé d'une succession de 8 brins β perpendiculaires à l'axe hélicoïdal de la fibre (Figure 8d). La liaison entre les deux protéines Tau dans la structure du PHF est localisée au niveau du brin β 3 et forme le cœur de la proto-fibre. Ces nouvelles données représentent une avancée majeure dans la compréhension du mécanisme d'agrégation de Tau dans la MA mais également pour les autres tauopathies.

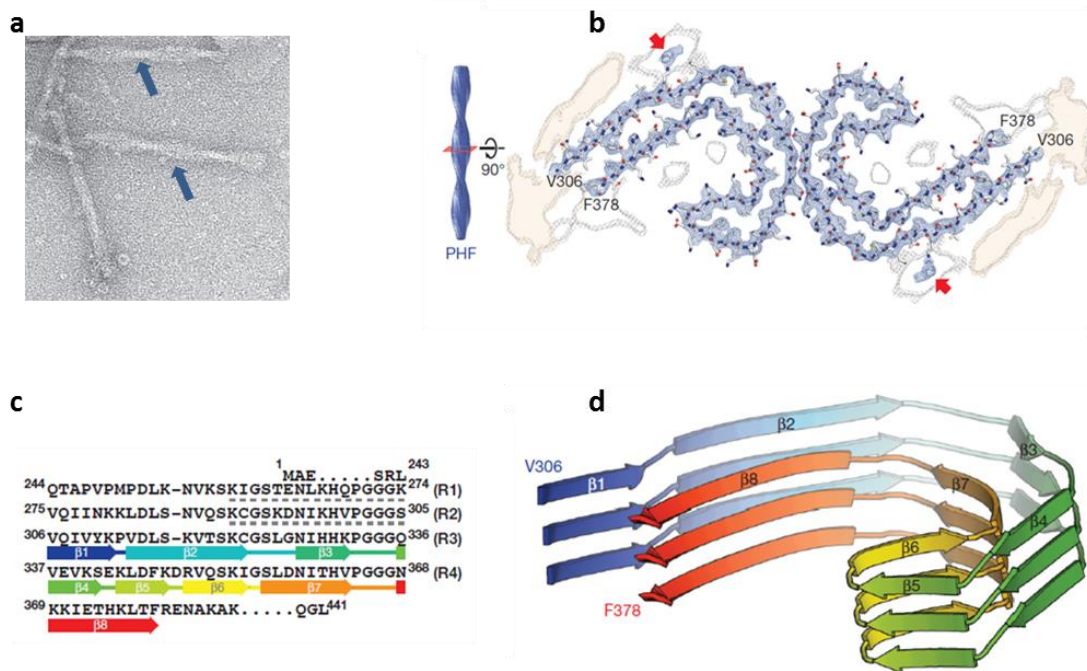


Figure 8 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de Tau contenue dans un PHF provenant d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (code PDB : 5O3L) (Fitzpatrick et al., 2017). a : Image provenant d'un cliché de microscopie électronique de PHFs purifiés (flèches bleues). b : Densité électronique et modèle atomique du cœur fibrillaire composant les PHFs. c : Alignement de séquence des 4 domaines répétés du MTBD. d : Composition en structures secondaires du cœur fibrillaire.

iii. Quel est le lien entre Tau et A β dans la Maladie d'Alzheimer ?

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par la formation de deux types d'agrégats protéiques particuliers composés du peptide A β et de la protéine Tau. La majorité des tauopathies est uniquement définie par la présence d'agrégats de Tau ce qui fait de la MA une tauopathie particulière. Dès lors, la communauté scientifique s'est interrogée sur la connexion qu'il pourrait exister entre A β et Tau dans la MA.

Au début des années 90, la théorie dominante défend l'idée que l'accumulation du peptide A β serait le point de départ de la pathologie (Hardy and Allsop, 1991; Hardy and Higgins, 1992). L'accumulation de A β entrainerait son agrégation formant ainsi les plaques séniles, provoquant des dysfonctionnements synaptiques et inflammatoires. Il s'ensuivrait une activation des protéines kinases induisant

l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau et enfin la formation des NFTs menant à la mort neuronale et à la perte des fonctions cognitives chez les patients. C'est l'hypothèse de la cascade amyloïde (Figure 9) (Hardy and Selkoe, 2002).

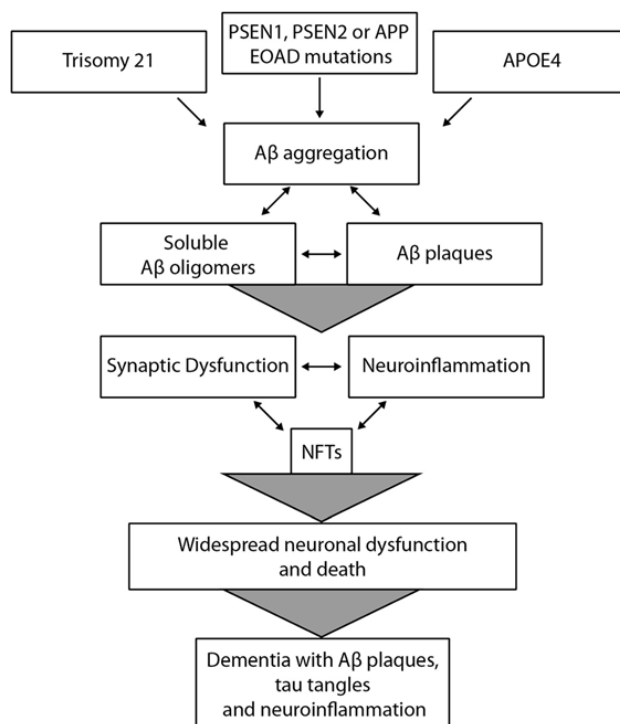


Figure 9 : Hypothèse de la cascade amyloïde adaptée de (Hardy and Higgins, 1992) par (Morris et al., 2014).

Certains travaux vont dans le sens de cette hypothèse. Des études génétiques ont révélées l'existence de formes familiales de la MA. En effet, des mutations retrouvées au niveau des gènes *app* et *psen1* et *psen2* codant pour deux sous unités formant la γ -secrétase entraînent une augmentation de la production d'A β (<https://www.alzforum.org/mutations>). Ceci supporte l'idée qu'une modification dans le métabolisme du peptide A β serait l'élément déclencheur de la maladie d'Alzheimer. De plus, différentes études ont montré que le peptide A β pouvait induire la phosphorylation de Tau en permettant l'activation de certaines kinases telles que la glycogène synthase kinase 3 GSK-3 et les « mitogen-activated protein kinase »(MAPK) dans des cultures primaires neuronales (Zheng et al., 2002). Plus récemment, un autre mécanisme de la toxicité du peptide A β a été suggéré. Il est connu que la protéine Fyn, appartenant à la famille des SRC kinases, possède des rôles majeurs dans les fonctions synaptiques des neurones (Ohnishi et al., 2011;

Trepanier et al., 2012). Fyn pourrait agir par l'intermédiaire de Tau en permettant sa relocalisation au niveau des dendrites (Ittner et al., 2010). Dans cette nouvelle étude, les formes oligomériques d'A β induiraient l'hyperphosphorylation de Tau par la voie des MAPK au niveau du compartiment somato-dendritique. Cette hyperphosphorylation et relocalisation de Tau serait médiée par la kinase Fyn (Li and Götz, 2017).

Ces travaux suggèrent que l'élément déclencheur de la MA serait A β et supportent l'hypothèse de la cascade amyloïde. Néanmoins de nombreux chercheurs s'opposent à cette hypothèse et proposent un rôle majeur de Tau dans la MA.

Tout d'abord, les formes familiales ne représentent qu'environ 1% des cas de MA. La majorité des cas recensés sont des formes sporadiques bien que des facteurs de risques génétiques y soit également associés (2018 Alzheimer's disease facts and figures, 2018). Il est donc difficile de relier l'hypothèse de la cascade amyloïde uniquement par l'existence de ces formes familiales. De plus, de nombreux patients sains présentent de multiples plaques séniles au sein de leur cerveau (Edison et al., 2007; Li et al., 2008). Il a également été montré que la sévérité du déclin cognitif chez les patients ayant développé une MA corrèle avec la pathologie Tau plutôt que A β (Nelson et al., 2012; Schwarz et al., 2016). Enfin, Oddo et ses collaborateurs ont réalisé une étude sur un modèle de souris développant les deux aspects de la maladie. Ils ont montré qu'une immunothérapie ciblant uniquement les plaques A β sans cibler la protéine Tau n'améliore pas la cognition, ce qui suggère qu'une réduction de la pathologie Tau est également essentielle pour rétablir la cognition (Oddo et al., 2006). L'ensemble de ces travaux est présenté à titre d'exemple. Toutefois, ils présentent la pathologie Tau comme l'élément responsable du déclin des fonctions cognitives chez les patients atteints de la MA.

Les pathologies Tau et A β sont essentielles au développement de la maladie d'Alzheimer. Cependant, leurs liens et leurs contributions respectives dans la maladie restent débattus. La pathologie Tau est-elle l'élément central pouvant expliquer le déclin cognitif ? A β pourrait-il jouer un rôle dans le déclenchement de la maladie et exercer sa toxicité par l'intermédiaire de Tau ? De nouvelles études

focalisées sur la synergie entre Tau et A β seront nécessaires pour comprendre de façon plus précise les mécanismes de cette maladie, afin de pouvoir proposer des solutions thérapeutiques efficaces.

B. Les tauopathies : caractéristiques générales

Hormis la maladie d'Alzheimer qui se caractérise par la présence de ces deux dépôts protéiques, d'autres équipes de recherches ont également montré que Tau pouvait être observée et impliquée dans d'autres pathologies neurodégénératives, regroupées sous le terme de tauopathies. Les autres tauopathies, plus rares, ont cependant une évolution plus rapide, généralement inférieure à une dizaine d'années entre les premiers symptômes et la mort des patients (Magne and Courbon, 2010).

Les tauopathies sont caractérisées par la présence d'agrégats de protéines Tau. Il en existe plus d'une vingtaine et le diagnostic reste difficile. Toutefois, des éléments phénotypiques et biochimiques permettent de les dissocier. En effet, certaines tauopathies se caractérisent par le type d'isoforme de Tau qui est contenu dans les agrégats. Par exemple, les agrégats de Tau retrouvés dans la maladie de Pick sont principalement constitués d'isoformes 3R (Buée Scherrer et al., 1996; Delacourte et al., 1996), contrairement aux agrégats identifiés dans la paralysie supranucléaire progressive (PSP) ou la dégénérescence corticobasale (CBD) qui sont constitués majoritairement d'isoformes 4R (Sergeant et al., 1999). Tandis que dans la MA, les agrégats sont composés à la fois des isoformes 3R et 4R. Les tauopathies sont également caractérisées par certaines mutations du gène *mapt* codant pour la protéine Tau, comme les démences fronto-temporales avec parkinsonisme associées au chromosome 17 (FTDP-17) (Ghetti et al., 2015). Les tauopathies présentent également des différences morphologiques, les agrégats de Tau étant retrouvés sous différentes formes et dans différents types cellulaires (Buée et al., 2000).

La progression spatio-temporelle des agrégats de Tau évoluent selon un schéma spécifique à chaque tauopathie. En 1991, Braak et ses collaborateurs proposent un mécanisme de progression de la pathologie Tau pour la maladie d'Alzheimer et

définissent 6 stades (I à VI), le stade VI représentant la forme la plus avancée de la pathologie (Figure 10). Les NFTs se forment au niveau de la région trans-entorhinale (stades I et II) et progressent jusqu'à l'isocortex puis le cortex tout entier (stade V et VI) (Braak and Braak, 1991). Ces différents stades sont communément appelés « stades de Braak » et sont utilisés aujourd'hui comme critères diagnostiques post-mortem de la maladie d'Alzheimer. Il en est de même pour la maladie à grains argyrophiles, les agrégats de Tau suivent un chemin spécifique au cours de l'évolution de la maladie (Saito et al., 2004). Ce n'est en revanche pas le cas pour la maladie de Pick qui se développe rapidement et présente une atrophie focalisée au niveau des lobes fronto-temporaux (Brion et al., 1991).

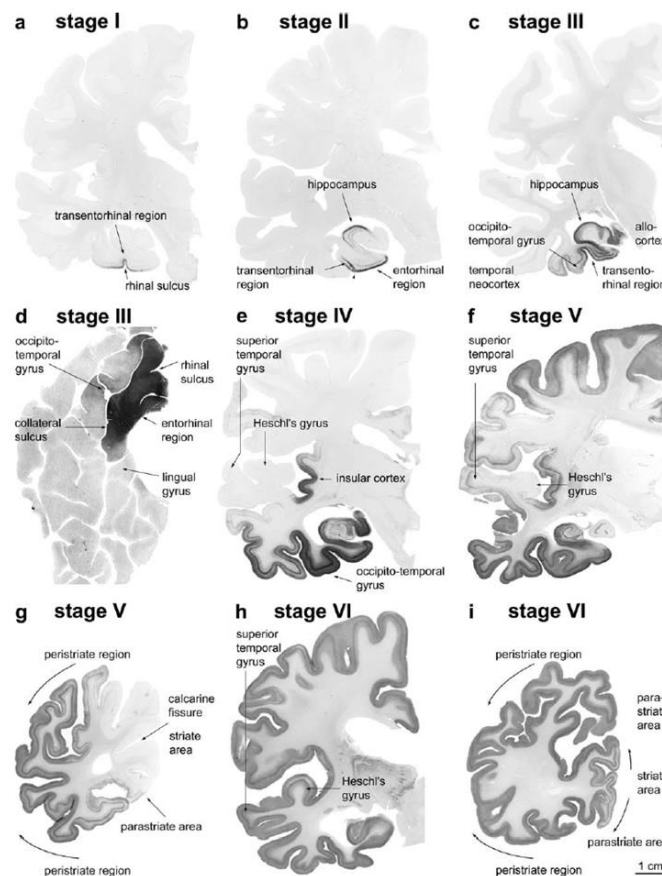


Figure 10 : La maladie d'Alzheimer évolue suivant une progression spatio-temporelle spécifique allant du stade I à VI, appelés « stades de Braak » (Braak et al., 2006).

III. Tau et agrégation

Nous avons vu précédemment que Tau est une protéine multifonctionnelle. En effet, elle est grandement impliquée dans la stabilité et le bon fonctionnement des neurones, mais également dans des fonctions moins bien définies, allant du noyau aux dendrites. Néanmoins, en conditions pathologiques, la protéine Tau passe d'un état soluble à un état agrégé et hyperphosphorylé, aboutissant à sa forme la plus stable : les filaments hélicoïdaux appariés (PHFs) formant eux-mêmes les dégénérescences neurofibrillaires (NFTs). Cette agrégation a des conséquences fonctionnelles importantes sur la viabilité et le bon fonctionnement des neurones (Figure 5) :

- Dépolymérisation des microtubules et dysfonctionnement du transport axonal.
- Atrophie des dendrites et altération de la transmission synaptique.
- Perte de la protection à l'ADN au niveau nucléaire, participant à l'accumulation des dommages oxydatifs.

L'agrégation de Tau entraînerait donc cette cascade d'évènements qui, cumulés, aboutiraient à la mort neuronale suivie d'un déclin cognitif chez les patients atteints d'une tauopathie.

Depuis la fin des années 1980 et encore aujourd'hui, de nombreux scientifiques étudient les mécanismes moléculaires qui régissent l'agrégation de la protéine Tau. Nous nous intéresserons dans cette partie aux principaux facteurs impliqués dans l'agrégation de Tau ainsi qu'aux nouvelles hypothèses et concepts pouvant expliquer la propagation de la pathologie Tau chez les patients atteints d'une tauopathie.

Des études principalement *in vitro* seront présentées et reposent sur deux techniques :

- La première est une méthode spectroscopique de fluorescence. Elle permet de suivre de façon quantitative la cinétique d'apparition des fibres en utilisant une molécule appelée la thioflavine. La thioflavine T (ThT), la plus couramment utilisée, émet un signal de fluorescence lorsque le fluorophore est incorporé dans les fibres (Friedhoff et al., 1998) (Figure 11a).

- La seconde est la microscopie électronique, qui permet de visualiser la présence de fibres et d'observer leur morphologie (Figure 11b).

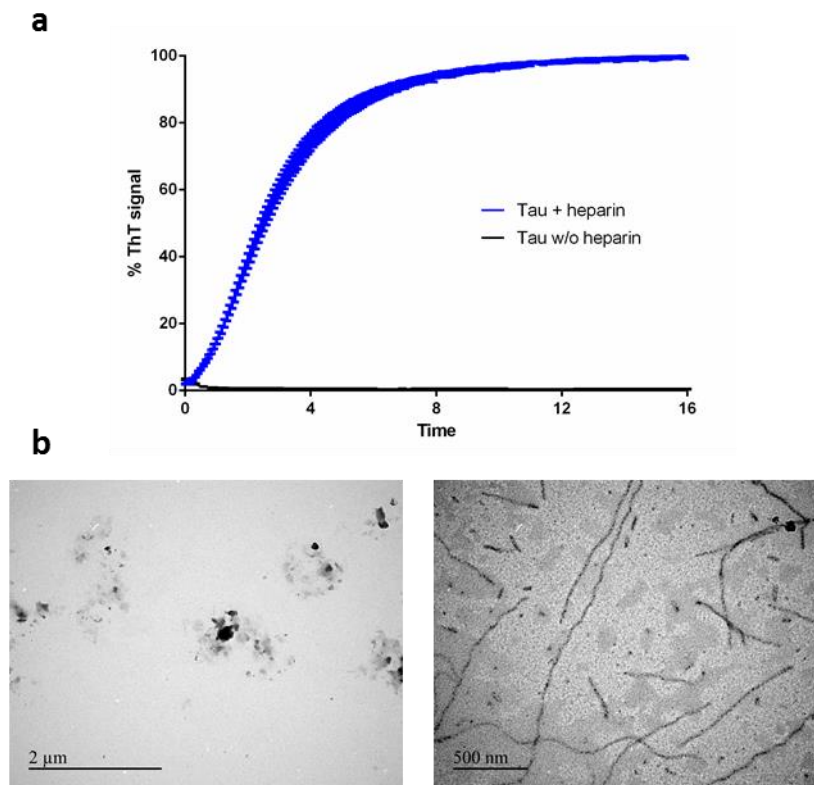


Figure 11 : a : Suivi par fluorescence de la ThT de la cinétique d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau 2N4R en absence d'héparine (courbe noire) et en présence d'héparine (courbe bleue). b : Cliché de microscopie électronique résultant de l'agrégation de la protéine Tau 2N4R sans héparine (cliché de gauche) ou avec héparine (cliché de droite) après 16 heures de réaction.

A. Les inducteurs polyanioniques

En 1996, Goedert et ses collaborateurs identifient une certaine classe de glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs) telles que les héparanes sulfates ou l'héparine, présents dans la matrice extracellulaire et capable d'induire l'agrégation *in vitro* de la protéine Tau recombinante WT ou préalablement phosphorylée (Goedert et al., 1996). La morphologie des fibres de Tau formées *in vitro* par la présence de ces GAGs diffère en fonction du type d'isoforme 3R ou 4R utilisé (Figure 12a). De manière intéressante, ces fibres de Tau synthétiques ne sont pas reconnues par un anticorps dirigé contre le MTBD (Figure 12b) et les mêmes résultats ont été obtenus à partir de fibres provenant de patients atteints de la MA (Goedert et al., 1992). Cela suggère à l'époque que ces deux types de fibres partagent une structure similaire et qui incluent le MTBD comme le principal constituant du cœur fibrillaire (Goedert et

al., 1996). Dans cette même étude, des marquages immunohistologiques réalisés sur des coupes de cerveaux de patients atteints de la MA révèlent un co-marquage de la Tau hyperphosphorylée avec les héparanes sulfates. A cette époque, il a été suggéré un rôle potentiel des GAGs dans le processus d'agrégation de Tau (Goedert et al., 1996). Depuis ces travaux, d'autres macromolécules dites « polyanioniques » ont également été décrites comme facteurs pouvant induire l'agrégation de Tau *in vitro*. C'est notamment le cas de certains acides gras incluant l'acide arachidonique (Wilson and Binder, 1997), l'ARN (Kampers et al., 1996) et les chaînes de polyglutamate (Friedhoff et al., 1998).

De plus, l'interaction entre Tau et l'héparine a été étudiée par RMN. Les résultats ont montré que l'héparine interagissait avec Tau principalement au niveau des sous domaines répétés R2 et R3, mais également au niveau de résidus localisés en N-ter et C-ter du MTBD. L'interaction avec l'héparine au niveau des régions R2 et R3 induirait un repliement de ces régions en brins β et pourrait correspondre au site de nucléation de Tau nécessaire à son agrégation (Sibille et al., 2006).

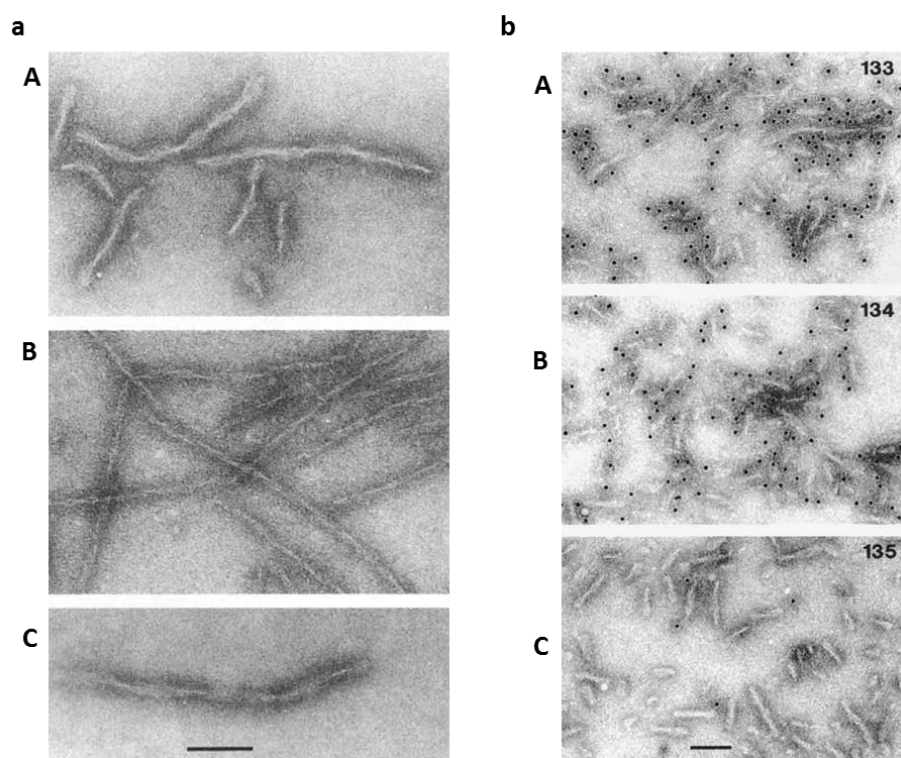


Figure 12 : a : Cliché de microscopie électronique de fibres de Tau résultant de l'agrégation de Tau 1N3R (A), 2N4R (B) et 1N3R préalablement phosphorylée par la kinase neuronale Cdc2 (C) induite *in vitro* par de l'héparine. b : Cliché de microscopie électronique de fibres de Tau résultant de l'agrégation de Tau 1N3R induite *in vitro* par de l'héparine puis marquées par des anticorps dirigés contre le domaine N-ter (A), C-ter (B) et le domaine MTBD (C) (Goedert et al., 1996).

Par la suite, de nombreuses équipes de recherche ont communément utilisé les GAGs pour induire l'agrégation de Tau *in vitro*, afin d'en étudier les mécanismes mais également pour tester des molécules potentiellement inhibitrices de son agrégation dans un but thérapeutique. Cependant, certaines études mettent maintenant en doute le modèle de la protéine Tau agrégée avec de l'héparine. En utilisant la résonance paramagnétique électronique (RPE) incluant la méthode DEER (pour « Double Electron–Electron Resonance spectroscopy »), Fichou et ses collaborateurs ont montré que les fibres de Tau induites par de l'héparine sont très hétérogènes et donc différentes, d'un point de vue structural, des fibres de Tau retrouvées dans la MA (Fichou et al., 2018). Ces nouvelles données suggèrent donc que l'utilisation de l'héparine et des autres molécules polyanioniques n'est pas adaptée pour l'étude d'agrégation de Tau.

Toutefois, certains points de cette étude restent controversés car si la RPE permet de mesurer des distances intramoléculaires entre résidus, elle permet également de mesurer des distances intermoléculaires, c'est-à-dire dans ce cas précis entre des résidus provenant de molécules de Tau différentes au sein même de l'empilement de la fibre. La proportion de fibres marquées par rapport à la proportion de fibres non marquées utilisées pour réaliser cette étude peut donc introduire un biais dans la mesure des distances.

Comme pour les fibres de Tau retrouvées dans la MA, l'utilisation de la cryo-microscopie électronique pourrait permettre d'estimer l'homogénéité structurale des fibres de Tau agrégée à l'aide d'héparine (Fitzpatrick et al., 2017).

Outre leur utilisation dans l'étude des mécanismes d'agrégation de Tau, un nouveau rôle des GAGs a été proposé récemment. Les GAGs pourraient être impliqués dans l'internalisation des formes pathologiques de Tau au sein des cellules et auraient donc un rôle important dans le phénomène de propagation de la protéine Tau de type prion (Holmes et al., 2013; Stopschinski et al., 2018). La propagation de type prion sera discutée de manière plus détaillée par la suite (cf Introduction, III, F : Tau et l'hypothèse de sa propagation de type prion, p55).

B. Implication du domaine de liaison aux microtubules dans le processus d'agrégation de Tau

A la fin des années 1980, une étude réalisée par Wischick et ses collaborateurs montre que le cœur des PHFs est principalement composé du domaine de liaison aux microtubules (MTBD) de Tau (Wischik et al., 1988). A la suite de ces travaux, Wille et ses collaborateurs ont montré l'importance du MTBD dans le processus d'agrégation de Tau. Dans cette étude, différentes constructions de Tau ont été produites chez *Escherichia coli* et purifiées (Figure 13a). L'analyse des formes agrégées de Tau a été réalisée par microscopie électronique. Les seules constructions de Tau capables de s'agréger spontanément *in vitro* sont K11 et K12 et correspondent respectivement au MTBD avec (4R) ou sans (3R) la région répétée R3. Ces constructions forment des fibres de morphologie très similaire aux PHFs retrouvés chez les patients atteints de la MA (Figure 13b) (Wille et al., 1992).

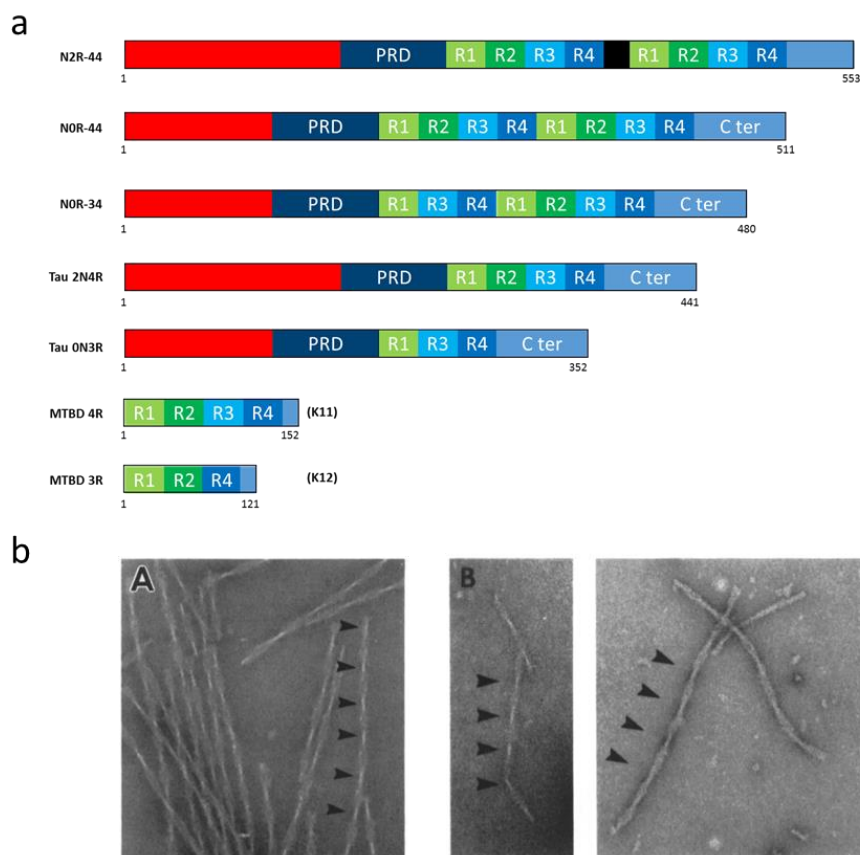


Figure 13 : a : Les différentes constructions de Tau utilisées pour l'étude d'agrégation. Les seules constructions capables d'agréger sans ajout d'inducteurs sont le K11 et le K12, qui correspondent respectivement au MTBD 4R et 3R. b : Cliché de microscopie électronique de fibres purifiées provenant d'un patient atteint de la maladie d'Alzheimer (A) et résultant de l'agrégation de la construction K12 (B). Figure adaptée de (Wille et al., 1992).

Ces études *in vitro* sont les prémices d'une description précise du domaine de liaison aux microtubules. Les motifs constituant le cœur d'agrégation de la protéine Tau ont été identifiés et correspondent à deux hexapeptides homologues nommés PHF6* (²⁷⁵VQIINK₂₈₀) et PHF6 (³⁰⁶VQIVYK₃₁₁) respectivement localisés dans les sous-domaines R2 et R3 du MTBD (Figure 14) (von Bergen et al., 2000, 2001). Le PHF6 est retrouvé dans toutes les isoformes de Tau contrairement au PHF6* retrouvé uniquement dans les isoformes 4R. Par ailleurs, les isoformes 4R ont tendance à s'agréger plus rapidement *in vitro* que les isoformes 3R de par la présence du PHF6*. Une étude récente a également montré que le PHF6* aurait un effet pro-agrégant plus important que le PHF6. Pour montrer cet effet, les auteurs de l'étude ont ingénieusement remplacé dans le MTBD le PHF6 par le PHF6* et inversement. Trois constructions codantes pour le MTBD « wild-type » (WT), le MTBD comprenant 2 PHF6* et enfin le MTBD comprenant 2 PHF6 ont été réalisées. La construction qui s'agrège le plus rapidement et de façon plus importante est le MTBD contenant les 2 PHF6* (Figure 15) (Seidler et al., 2018).

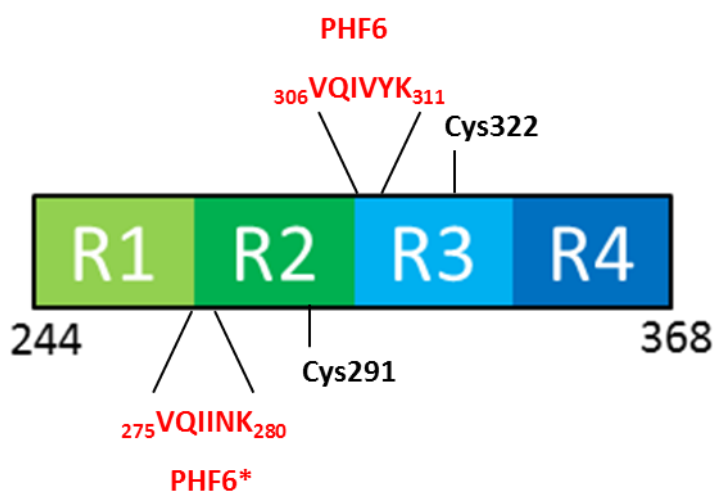


Figure 14 : Schéma du domaine de liaison au microtubule (MTBD). Les deux motifs PHF6* et PHF6 ainsi que les cystéines sont annotés.

Ces fragments sont également capables de s'agréger spontanément en solution et forment des structures en brins β dans les PHFs. De manière intéressante, l'introduction de mutation de type proline dans le PHF6 inhibe complètement l'agrégation du MTBD ce qui montre aussi l'importance de ce peptide dans

l'agrégation de Tau. Il est également montré dans cette étude que des agrégats correspondant au MTBD sont capables d'accélérer le processus d'agrégation de la protéine Tau entière (von Bergen et al., 2000).

D'autre part, une autre étude met en évidence l'importance des cystéines 291 (Cys291) et 322 (Cys322) contenues dans le MTBD dans le processus d'agrégation de Tau (Figure 14). En effet, les cystéines pourraient être essentielles dans l'assemblage de dimères de Tau via la formation de ponts disulfures intermoléculaires. Ces dimères pourraient être à l'origine de la formation des agrégats de Tau et ainsi des PHFs (Bhattacharya et al., 2001).

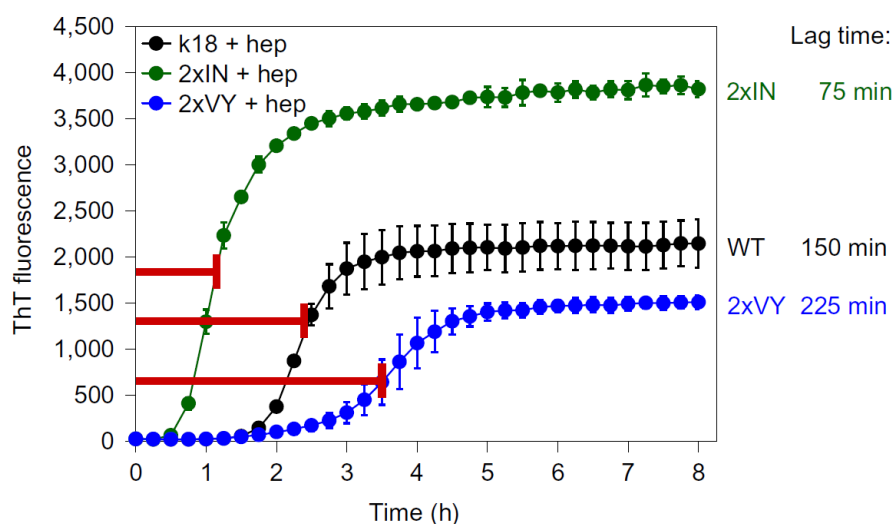


Figure 15 : Suivi par fluorescence de la ThT de la cinétique d'agrégation *in vitro* du MTBD (K18) WT (courbe noire), du K18 contenant 2 PHF6 (2*VY) (courbe bleue) et du K18 contenant 2 PHF6* (2*IN) (courbe verte) en présence d'héparine (Seidler et al., 2018).

Grâce aux avancées technologiques, la première structure hautement résolue d'un PHF provenant d'un patient atteint de la MA a été déterminée récemment (Figure 8) (Fitzpatrick et al., 2017). Comme décrit dans la partie précédente, on y retrouve principalement les sous-domaines R3 incluant le PHF6, R4 et une partie du domaine C-ter (V306-F378) (Figure 8c) qui forment une structure très organisée en brins β . De manière intéressante, on note l'absence du R2 contenant le PHF6* dans cette structure, pourtant décrit comme étant impliqué dans l'agrégation. Néanmoins, cette absence peut expliquer la présence des 6 isoformes composant les PHFs dans la MA, le cœur des fibres étant composé uniquement des régions R3, R4 et d'une

partie du C-ter de Tau (Fitzpatrick et al., 2017). De plus, la manière dont Tau passe d'un état soluble à un état agrégé jusqu'à obtenir sa forme finale sous forme de PHF n'est toujours pas connue à ce jour. Le fait que le PHF6* ne soit pas retrouvé dans les PHFs de Tau dans la MA ne signifie pas qu'il ne contribue pas à leur formation. La résolution par cryo-microscopie électronique de structures de PHF de tauopathies de type 4R telles que la PSP, la CBD ou les FTDP-17 pourrait permettre d'éclaircir le rôle et la contribution de ces deux motifs dans l'agrégation de Tau. Des travaux récents ont également mis en évidence la structure du cœur des fibres 3R de Tau retrouvées dans la maladie de Pick (Falcon et al., 2018). On y retrouve cette fois-ci une structure complètement différente qui comprend les régions répétées R1, R3 et R4 toujours organisés en une succession de brins β . La présence de la région R1 dans cette structure confirme également des résultats obtenus auparavant. En effet, on note une absence totale de marquage sur des coupes de cerveau de patients atteints d'une maladie de Pick par des anticorps dirigés contre la sérine 262 phosphorylée (pS262) (Ikeda et al., 2002). La résolution de la structure a permis de montrer qu'en présence de la pS262, le R1 ne serait plus capable de former le cœur du PHF (Falcon et al., 2018). Ces résultats démontrent que les agrégats de Tau composant les PHFs pourraient avoir une conformation qui serait spécifique à chaque tauopathie.

La détermination des structures composant le cœur des PHFs de différentes tauopathies permettra de comprendre les mécanismes d'agrégation de Tau et ouvrira la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques à chaque tauopathie, ou bien permettra de proposer une thérapie commune à toutes.

Nous avons pu voir le rôle essentiel du MTBD et des deux motifs PHF6* et PHF6, dans l'agrégation de Tau. Une grande partie de ce MTBD compose le cœur des fibres de Tau et est retrouvé dans les cerveaux de patients atteints de tauopathies. Cependant, bien que les peptides PHF6* et PHF6 ainsi que les fragments du MTBD utilisés dans ces études peuvent présenter une tendance spontanée à l'agrégation, la protéine Tau entière seule ne s'agrège pas en conditions *in vitro*. Cela suggère que d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux sont également impliqués. Les trois prochains sous chapitres présenteront ces différents facteurs et leurs contributions dans le processus d'agrégation de Tau.

C. Mutations et agrégation de Tau

A la fin des années 1990, une communauté de chercheurs travaillant sur les tauopathies a découvert plusieurs mutations intervenant sur le gène *mapt*, et provenant de patients atteints d'une FTDP-17 (M. G. Spillantini et al., 1998). Ces résultats ont permis de découvrir la première tauopathie familiale associée à des mutations sur *mapt*, appelée par la suite FTDP-17 *mapt*. Aujourd'hui, plus de 53 mutations exoniques et introniques sont connues pour être associées aux FTDP-17 *mapt* (Figure 16). La majorité de ces mutations sont retrouvées dans les exons 9, 10, 11 et 12 qui composent les domaines répétés du MTBD. De manière intéressante, la forme des agrégats de Tau et les phénotypes neuropathologiques diffèrent en fonction des mutations (Ghetti et al., 2015).

Les mutations introniques sont majoritairement observées au niveau de l'intron qui suit l'exon 10. Ces mutations jouent un rôle important dans la production d'isoformes de Tau 4R lors de l'épissage alternatif (D'Souza et al., 1999; Maria Grazia Spillantini et al., 1998). Une augmentation de la production de l'isoforme 4R pourrait notamment modifier le ratio 4R/3R intracellulaire et impacter la régulation de la stabilité des microtubules mais également agir directement sur son agrégation (Adams et al., 2010).

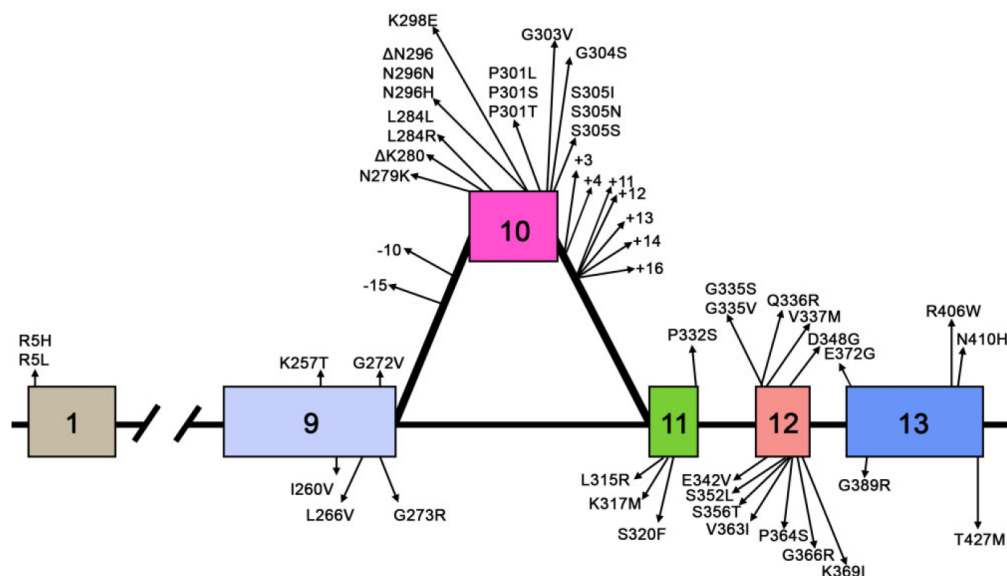


Figure 16 : Les différentes mutations introniques et exoniques qui interviennent sur *mapt* et qui sont aujourd'hui connues comme mutations associées à la tauopathie familiale FTDP-17 (Ghetti et al., 2015).

L'effet des mutations exoniques sur la pathologie Tau a largement été étudié (Ghetti et al., 2015). La mutation la plus fréquente est la substitution de la proline 301 en leucine (P301L). Mais il en existe de nombreuses autres telles que la substitution de la proline 301 en sérine (P301S) ou la délétion de la lysine 280 (Δ K280) (Figure 16). De nombreuses études ont montré que certaines mutations réduisaient la capacité de Tau à promouvoir l'assemblage des microtubules (Hasegawa et al., 1998; Hong et al., 1998) via une dérégulation de sa phosphorylation (Dayanandan et al., 1999). Il a également été suggéré que ces mutations pouvaient induire une hyperphosphorylation de Tau conduisant à son agrégation (Alonso et al., 2004). De manière intéressante, certaines de ces mutations sont localisées au niveau des cœurs de nucléation de Tau : les substitutions P301L et P301S sont localisées à l'intersection des sous-domaines R2-R3 et la délétion Δ K280 est même retrouvée dans le PHF6*. La différence des phénotypes des fibres de Tau retrouvées chez les patients FTDP-17 *mapt* suggère un lien direct entre ces mutations et l'agrégation de Tau. Les mutations Δ K280 et P301L exacerbent l'agrégation de Tau, l'effet le plus important étant retrouvé pour la mutation Δ K280 (von Bergen et al., 2001).

Afin de comprendre les mécanismes d'agrégation de Tau, de nombreux scientifiques ont également développé des modèles cellulaires et murins exprimant une protéine Tau humaine et portant une à plusieurs mutations FTDP-17 *mapt*.

Le premier modèle cellulaire d'agrégation de Tau a été développé à partir de cellules de neuroblastomes de souris (N2A). Ces cellules expriment le MTBD (souvent nommé K18 dans la littérature) de Tau non modifié ou portant la mutation Δ K280. Le pourcentage d'agrégats retrouvé est plus important pour les cellules exprimant le MTBD Δ K280, prouvant une fois de plus l'effet pro-agrégant de la mutation Δ K280 (Figure 17a). Ces premières études ont également montré que ces agrégats sont toxiques pour les cellules (Khistunova et al., 2006).

Des modèles cellulaires basés sur la technique de FRET ont également été créés. Dans ces modèles, différentes constructions de Tau portant des mutations Δ K280 ou P301S sont fusionnées à des protéines fluorescentes de type CFP (pour cyan fluorescent protein) et YFP (pour yellow fluorescent protein). Lorsque ces

constructions agrègent, un transfert de fluorescence est observé de la CFP vers la YFP, traduisant un signal FRET correspondant à une agrégation (Holmes et al., 2014; Kfoury et al., 2012) (Figure 17b). Cette lignée cellulaire est maintenant commercialisée et est utilisée comme modèle intracellulaire de « seeding ».

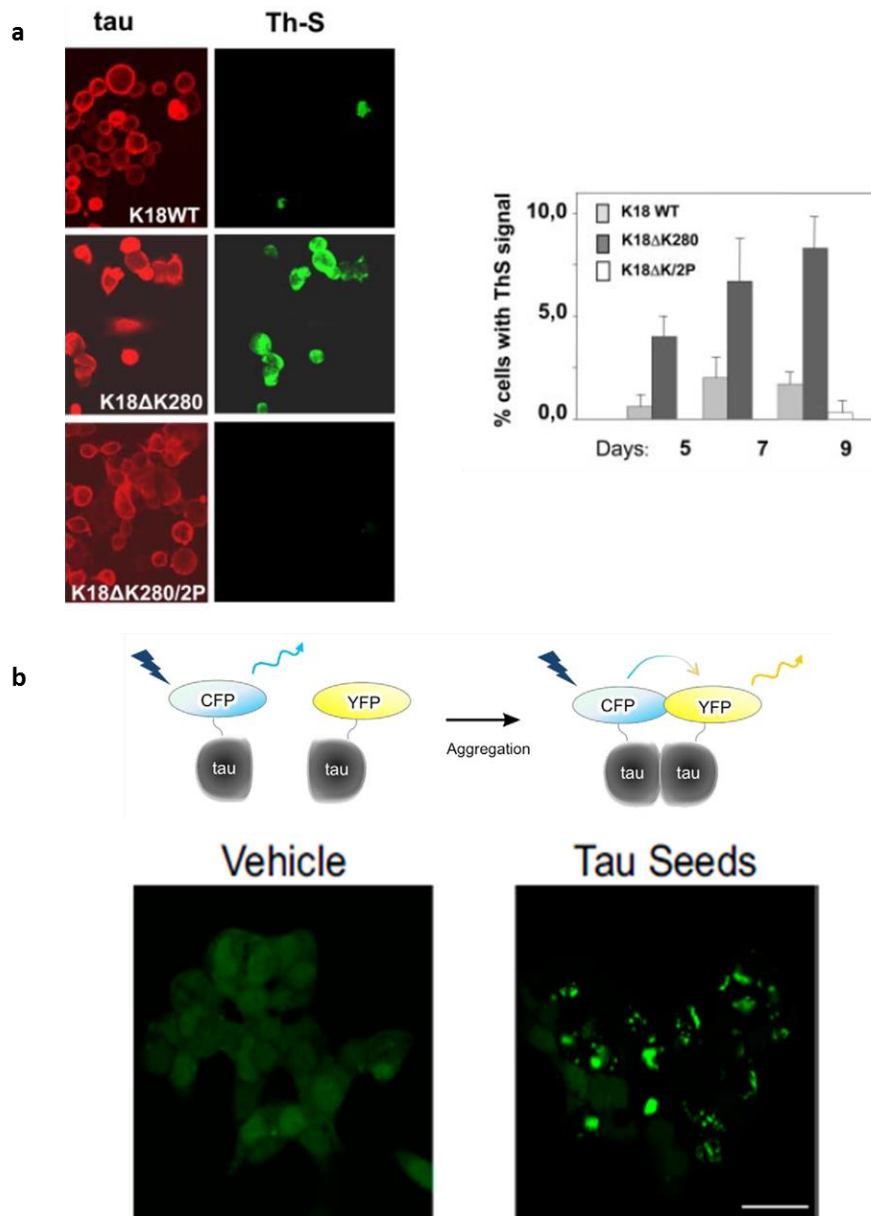


Figure 17 : Modèles cellulaires d'agrégation de la protéine Tau. a : modèle d'induction à la tétracycline. Le pourcentage de cellules positives à la Thioflavine S (ThS) est plus important pour les cellules qui surexpriment le MTBD Δ K280. L'insertion de mutations de type proline dans le motif PHF6* (K18 Δ K280/2P) inhibe l'agrégation de la construction de Tau dans ce modèle (Khistunova et al., 2006). b : Modèle d'agrégation intracellulaire reposant sur la méthode FRET. Lorsque les protéines MTBD P301S agrègent, un signal FRET est détecté et permet de quantifier le pourcentage d'agrégats par microscopie confocale ou cytométrie de flux (Figure 17b adaptée de (Holmes et al., 2014; Lim et al., 2014).

D'autre part, des modèles de souris ont été développés afin de mimer la pathologie Tau au sein du cerveau ainsi que les déclin cognitifs retrouvés dans les tauopathies. Les premiers modèles développés étaient des modèles de surexpression de Tau WT sans mutation. On observait dans la plupart de ces modèles une hyperphosphorylation de Tau, mais aucun changement neuropathologique telles que les dégénérescences neurofibrillaires (NFTs) (Brion et al., 1999; Götz et al., 1995).

Afin de modéliser les tauopathies, des modèles de souris transgéniques surexprimant Tau ont été générés, possédant des mutations FTDP-17 et en particulier les mutations dans l'exon 10 (Denk and Wade-Martins, 2009).

Une grande quantité de lignées transgéniques ont été générées avec la mutation P301L. La plupart de ces modèles développent des dégénérescences neurofibrillaires (NFTs). La localisation de ces NFTs est dépendante du type de promoteur utilisé ainsi que de l'isoforme de Tau surexprimé (Lewis et al., 2000; Murakami et al., 2006; Pennanen et al., 2006).

Deux types de modèles ont également été développés au sein du laboratoire. Ces modèles surexpriment la protéine Tau 1N4R portant deux mutations FTDP-17 G272V et P301S, sous le contrôle du promoteur Thy1.2. Le premier modèle appelé THY-Tau22 présente une hyperphosphorylation de cette protéine Tau, la formation de nombreuses NFTs ainsi que l'apparition de déficits cognitifs dès l'âge de trois mois (Schindowski et al., 2006). Le second modèle est appelé THY-Tau30. Dans ce modèle, la surexpression de Tau est cérébrale mais également spinale. La particularité de ce modèle réside dans l'apparition de lésions neuronales et de déficits cognitifs, mais également dans la formation de NFTs dans la moelle épinière suivie par l'apparition de troubles moteurs (Leroy et al., 2007).

Ces études réalisées à l'aide de modèles cellulaires et murins montrent l'importance des mutations FTDP-17 dans le processus d'agrégation de Tau et donc dans le déclin cognitif que l'on observe chez les patients.

Mais qu'en est-il des tauopathies sporadiques telles que la MA ? En effet, à ce jour, aucune mutation n'a été découverte sur le gène *mapt* pour ces patients. Ces informations suggèrent que d'autres facteurs doivent être impliqués dans le processus d'agrégation de Tau.

D. Modifications post-traductionnelles et agrégation de Tau

En raison de son caractère désordonné, la protéine Tau est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs) comprenant la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'O-GlcNacylation et bien d'autres (Figure 18). Dans cette partie, nous présenterons ces principales MPTs ainsi que leurs potentiels rôles dans le processus d'agrégation de Tau.

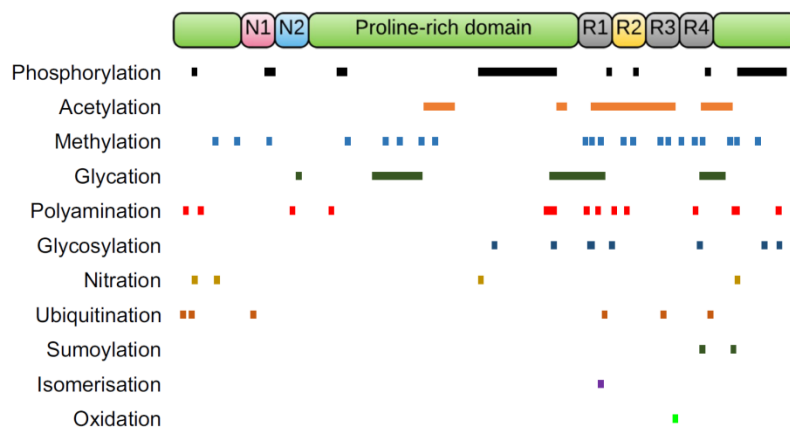


Figure 18 : Tau et ses nombreuses modifications post-traductionnelles (Guo et al., 2017).

i. Tau et phosphorylation

La phosphorylation de Tau est la MPT la plus décrite dans la littérature. Tau contient en effet 85 sites potentiels de phosphorylation incluant 45 sérines, 35 thréonines et 5 tyrosines (Hanger et al., 2009), pouvant influencer et réguler de façon physiologique ses fonctions.

En effet, de nombreuses études ont montré que la phosphorylation de Tau régule sa propre affinité pour les microtubules et agit ainsi sur leur stabilité (Drewes et al., 1995; Sengupta et al., 1998). La phosphorylation de Tau agirait également sur son propre transport axonal notamment en modulant son affinité pour les kinésines (Cuchillo-Ibanez et al., 2008).

Dans de nombreuses tauopathies, la protéine Tau est agrégée sous une forme hyperphosphorylée (Grundke-Iqbal et al., 1986). Depuis cette découverte, certains scientifiques ont suggéré que l'hyperphosphorylation de Tau serait le mécanisme déclencheur de son agrégation.

En 2001, Alonso et ses collaborateurs ont montré que les formes phosphorylées et solubles de Tau retrouvées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont capables d'agréger *in vitro*. De plus, l'hyperphosphorylation de différentes constructions recombinantes de Tau par de l'extrait de cerveau de rat induirait également leur agrégation *in vitro*. Ils ont donc proposé un mécanisme où l'hyperphosphorylation de Tau serait suffisante pour déclencher son agrégation (Alonso et al., 2001). A partir de ces résultats, une autre équipe de recherche a tenté d'identifier certaines kinases qui pourraient potentiellement être impliquées dans la phosphorylation de Tau déclenchant son agrégation. Ils ont notamment identifié deux kinases, Dyrk1A et GSK-3 β qui phosphorylent des sites de Tau différents. Après phosphorylation *in vitro* par ces enzymes, la protéine Tau est observée sous une forme agrégée, suggérant qu'une dérégulation des kinases phosphorylant Tau pourrait être à l'origine de son agrégation (Liu et al., 2007).

Au laboratoire, nous avons également étudié l'impact de la phosphorylation sur l'agrégation de Tau. Nous avons utilisé la kinase ERK2 (pour « Extracellular Signal-regulated Kinase ») pour phosphoryler la protéine Tau *in vitro*. Il a en effet été reporté que la protéine ERK est surexprimée chez les patients atteints de la MA (Arendt et al., 1995). De manière intéressante, les résidus phosphorylés par ERK2 correspondent pratiquement aux mêmes résidus phosphorylés par l'extrait de cerveau de rat (Qi et al., 2016). Tau phosphorylée par ERK2 ou par l'extrait de cerveau de rat est plus sensible à l'agrégation que la protéine non modifiée, suggérant de nouveau que la phosphorylation de Tau pourrait induire son agrégation. Néanmoins, la proportion de ces fibres agrégées reste très faible, et la détection des fibres de Tau par la thioflavine T s'est révélée négative (Qi et al., 2016). A partir de ces résultats contradictoires, il est difficile de conclure sur la contribution de la phosphorylation dans l'initiation de l'agrégation de Tau.

Toutefois, une autre étude récente réalisée au laboratoire a permis d'identifier un motif spécifique de phosphorylation induisant l'agrégation de Tau. En présence des résidus sérine 202, thréonine 205 et sérine 208 phosphorylés ainsi qu'en absence de phosphorylation sur la sérine 262, la protéine Tau agrège spontanément *in vitro* (Despres et al., 2017) (Figure 19).

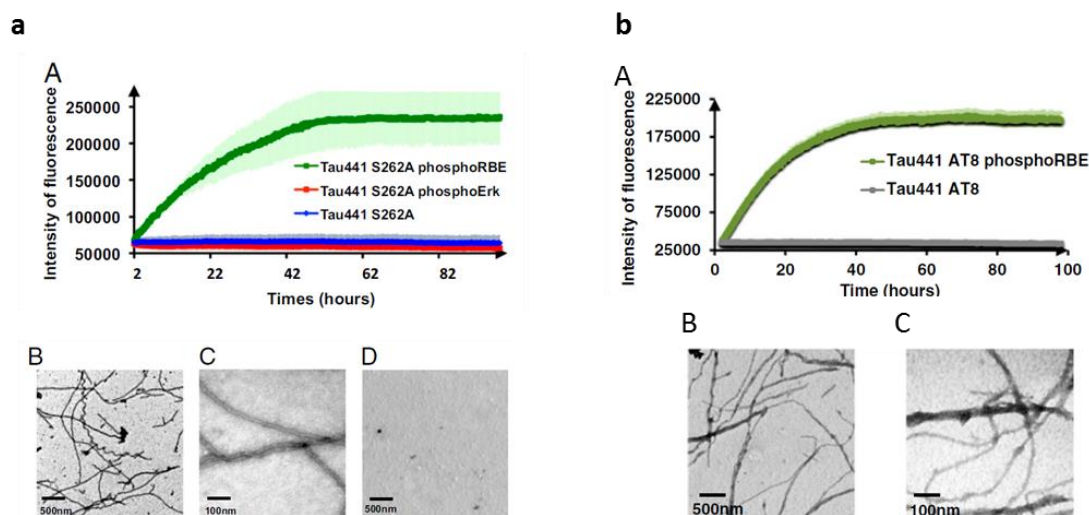


Figure 19 : a : Suivi par fluorescence de la ThT de la cinétique d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau 2N4R S262A non phosphorylée (courbe bleue) , phosphorylée par la protéine ERK (courbe rouge) et phosphorylée par de l'extrait de cerveau de rat (courbe verte) (A). Clichés de microscopie électronique résultant de l'agrégation de la protéine Tau 2N4R S262 phosphorylée par de l'extrait de cerveau de rat (B, C) et phosphorylée par la protéine ERK (D). b : Suivi par fluorescence de la ThT de la cinétique d'agrégation *in vitro* de la protéine Tau 2N4R AT8 non phosphorylée (courbe grise) et phosphorylée par de l'extrait de cerveau de rat (courbe verte) (A). La protéine Tau 441 AT8 correspond à Tau 2N4R mutée en alanine sur tous les sites théoriquement phosphorylés par l'extrait de cerveau de rat excepté la sérine 202, la thréonine 205 et la sérine 208. Clichés de microscopie électronique résultant de l'agrégation de la protéine Tau 2N4R AT8 phosphorylée par de l'extrait de cerveau de rat (B,C) (Despres et al., 2017).

Ces résultats démontrent pour la première fois une relation spécifique entre phosphorylation et agrégation. Certaines phosphorylations pourraient être activatrices de l'agrégation. A l'inverse, d'autres phosphorylations pourraient avoir un rôle de protection contre l'agrégation comme la phosphorylation de la sérine 262 notamment absente dans la maladie de Pick (Ikeda et al., 2002).

ii. Tau et acétylation

L'acétylation est la deuxième MPT la plus importante après la phosphorylation. La protéine Tau contient en effet 44 lysines susceptibles d'être acétylées. En 2010, Min et ses collaborateurs ont montré que la protéine Tau acétylée était notamment observée de manière plus importante à certains stades de Braak chez des patients atteints de la MA. De plus, l'acétylation de Tau réduirait sa propre dégradation quand elle est phosphorylée, suggérant ainsi un lien entre hyperphosphorylation, accumulation et agrégation de Tau dans les tauopathies (Min et al., 2010). Par la suite, Cohen et ses collaborateurs se sont intéressés au rôle de l'acétylation sur

l'agrégation de Tau. Ils ont observé que la protéine Tau acétylée ne polymérise plus la tubuline en microtubules et agrège plus rapidement *in vitro* (Figure 20a) (Cohen et al., 2011). Néanmoins le rôle réel de l'acétylation sur la pathologie Tau reste encore mal défini. D'autres études ont d'ailleurs montré l'effet inverse où la protéine Tau non acétylée agrègerait plus rapidement *in vitro* que la protéine Tau acétylée (Figure 20b) (Cook et al., 2014; Kamah et al., 2014).

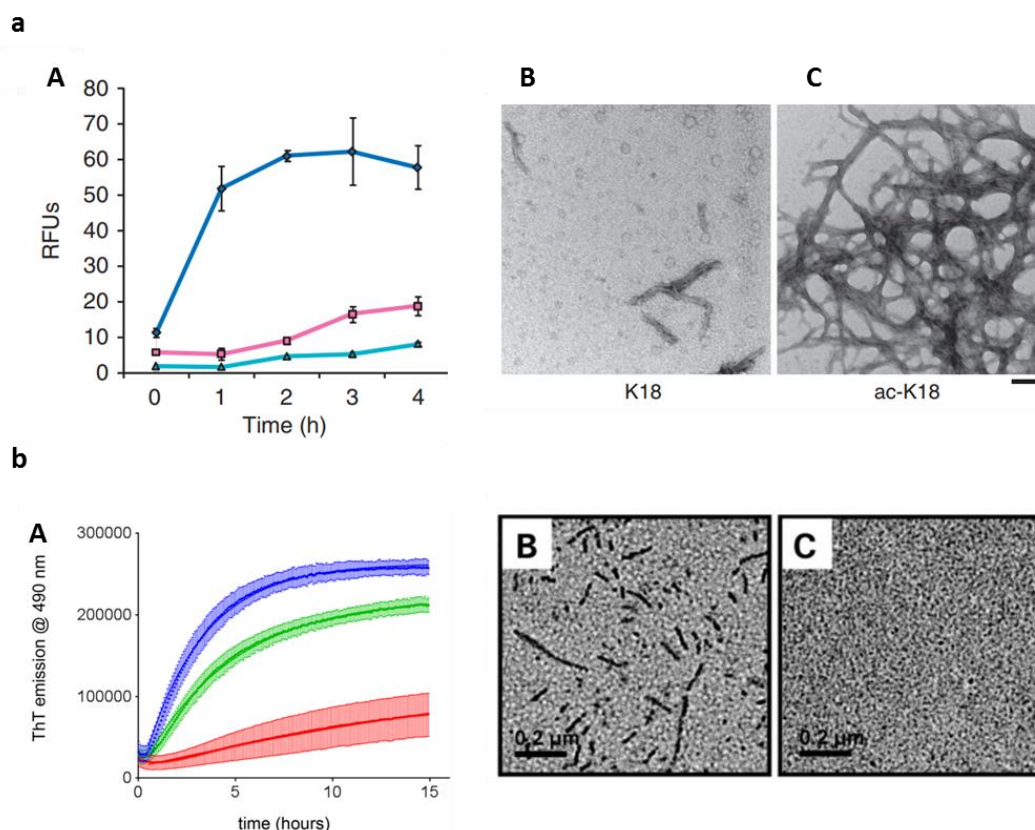


Figure 20 : a : Suivi par fluorescence de la ThT de la cinétique d'agrégation *in vitro* par de l'héparine du MTBD (K18) non acétylé (courbe rose), préalablement acétylé par la « CREB binding protein » (CBP) (courbe bleue) et du MTBD (K18) portant la mutation K311D préalablement acétylé par la CBP (courbe turquoise) (A). Clichés de microscopie électronique résultant de l'agrégation du MTBD non acétylé (B) et préalablement acétylé (C) (Cohen et al., 2011). b : Suivi par fluorescence de la ThT de la cinétique d'agrégation *in vitro* par de l'héparine de la protéine Tau 2N4R non acétylée (courbe bleue), acétylée de façon non enzymatique (courbe verte) et acétylée par la CBP (courbe rouge) (A) (Kamah et al., 2014). Clichés de microscopie électronique résultant de l'agrégation de la protéine Tau non acétylée (B) et acétylée par la protéine p300 (C) (Cook et al., 2014).

Tout comme pour la phosphorylation, il est possible que certains résidus acétylés spécifiques contribuent à l'agrégation de Tau et inversement (Cook et al., 2014). En utilisant un anticorps ciblant la protéine Tau acétylée sur la lysine 280, Cohen et ses collaborateurs ont montré que cette acétylation était étroitement associée aux agrégats de Tau retrouvés en conditions pathologiques *in vivo* (Cohen et al., 2011).

Et de manière intéressante, l'acétylation de la lysine 280 exerce également une neurotoxicité *in vivo*, dans un modèle de drosophile transgénique (Gorsky et al., 2016) ce qui suggère un rôle important de la lysine 280 acétylée dans la pathologie Tau. De même, l'acétylation de la lysine 174 exercerait une toxicité de la protéine Tau associée à des déclin cognitifs importants *in vivo* (Min et al., 2015).

Il est également possible que s'opère une synergie entre différentes MPTs, et que cet ensemble contrôle l'agrégation de Tau. Récemment, Carlomagno et ses collaborateurs ont proposé un mécanisme dans lequel l'acétylation de Tau pourrait inhiber la phosphorylation spécifique de certains résidus, et ainsi contribuer à inhiber son agrégation (Carlomagno et al., 2017).

iii. Tau et tronctions

Le clivage protéolytique intervenant sur les protéines n'est pas toujours considéré comme une MPT à part entière. Néanmoins, ce type de modification est souvent associé à des maladies neurodégénératives telle que la MA, la maladie de Pick ou encore la PSP. Une analyse du cerveau de patients atteints de ces maladies démontre la présence de nombreux fragments tronqués de Tau (Arai et al., 2004; Derisbourg et al., 2015; Gamblin et al., 2003; Guillozet-Bongaarts et al., 2007). De plus, certaines de ces formes tronquées semble être spécifiques à certaines tauopathies comme la maladie d'Alzheimer (Novak et al., 1993; Vechterova et al., 2003). La génération de certaines formes tronquées de Tau pourrait être réalisée par des caspases qui sont des enzymes protéolytiques qui interviennent majoritairement lors du processus d'apoptose (Cohen, 1997). C'est le cas pour la forme tronquée de Tau en position C-terminale Asp421 qui est notamment retrouvée dans la MA et semble être directement liée au développement de la pathologie Tau (Rissman et al., 2004). Des études réalisées *in vitro* ont montré que certaines formes tronquées en position C-terminale de Tau ont tendance à agréger plus rapidement que la protéine Tau entière (Abraha et al., 2000; Berry et al., 2003). La contribution de ces formes tronquées de Tau dans la pathologie a également été étudiée *in vivo*. Des rats exprimant différentes formes tronquées de Tau développent une phosphorylation importante de Tau ainsi que des dégénérescences neurofibrillaires (Zilka et al., 2006).

iv. Autres modifications post-traductionnelles de Tau

Hormis les trois MPTs discutées précédemment, Tau est la cible d'autres MPTs qui interviennent dans la régulation de ses fonctions physiologiques. Certaines de ces MPTs pourraient également contribuer à la pathologie Tau.

La glycosylation est une MPT associée à la maladie d'Alzheimer (Wang et al., 1996). Le rôle de la glycosylation dans le processus d'agrégation reste inconnu mais des travaux ont tout de même montré que la glycosylation de Tau pourrait moduler sa phosphorylation sur certains résidus et ainsi contribuer à son hyperphosphorylation (Liu et al., 2002).

A l'inverse, l'*O*-GlcNAcylation de Tau, au niveau de résidus Ser/Thr, est diminuée dans la maladie d'Alzheimer. Tau *O*-GlcNAcylée est en effet moins phosphorylée (Liu et al., 2004) et protège contre son agrégation dans des études réalisées *in vitro* (Yuzwa et al., 2014). De plus, des modèles de souris transgéniques ayant une déficience pour l'*O*-GlcNAcyltransférase spécifique du cerveau induit une dégénérescence progressive, accompagnée d'une hyperphosphorylation de Tau (Wang et al., 2016). La glycation, la déamidation, la nitration et l'isomérisation sont également des MPTs de Tau observées pour des patients atteints de la MA, et pourraient avoir un rôle dans l'agrégation de Tau (Reyes et al., 2012; Watanabe et al., 2004).

La majorité de ces MPTs sont dérégulées dans la maladie d'Alzheimer ainsi que dans d'autres tauopathies. Certaines de ces MPTs semblent avoir un rôle essentiel dans le processus d'agrégation de Tau. Inversement, d'autres semblent avoir un rôle de protection contre l'agrégation. Néanmoins, conclure sur le rôle précis de chacune de ces MPTs sur l'agrégation de Tau reste difficile.

La contribution de chacune de ces MPTs ainsi que la chronologie des événements restent également totalement inconnues. Toutefois, il est possible que l'association de certaines MPTs puisse déclencher l'agrégation. On peut imaginer qu'une dérégulation conjointe de MPTs telles que la phosphorylation de certains résidus, la

déacétylation sur d'autres, ainsi que la contribution d'autres MPTs, finissent par déclencher l'agrégation de Tau en conditions pathologiques.

E. Les formes oligomériques : espèces pathologiques de Tau ?

En conditions pathologiques, Tau est agrégée sous forme de PHFs qui constituent majoritairement les NFTs. Les PHFs ont été considérés pendant de nombreuses années comme le facteur principal de toxicité conduisant à la mort neuronale et au déclin cognitif chez les patients atteints d'une tauopathie telle que la MA (Giannakopoulos et al., 2003).

Cependant, des études très récentes et réalisées *in vivo* chez le rat ont montré que les espèces fibrillaires de Tau ne sont pas forcément les formes les plus toxiques à l'inverse des formes solubles et phosphorylées de Tau. Ces données suggèrent que la formation des formes agrégées de Tau pourrait résulter d'un mécanisme intrinsèque de protection cellulaire (d'Orange et al., 2018).

Ces travaux appuient l'émergence d'une nouvelle hypothèse suggérant que les formes les plus toxiques de Tau seraient en réalité des espèces intermédiaires entre formes solubles et formes fibrillaires appelées oligomères.

Toutefois, la difficulté d'étudier les oligomères de Tau réside dans la capacité à pouvoir les isoler et les détecter. Ce sont des formes intermédiaires et elles ont donc une tendance à évoluer au cours du temps. Toutefois, une équipe de recherche a réussi à développer un anticorps dirigé contre une forme dimérique de Tau mais également capable de reconnaître des formes oligomériques. Avec l'aide de cet anticorps, ils ont détecté la présence spécifique de ces oligomères dans des échantillons de cerveaux provenant de patients Alzheimer (Patterson et al., 2011). En 2014, des études ont montré qu'une hyperphosphorylation de Tau permettrait sa conversion vers un état oligomérique alors que les formes non-phosphorylées évolueraient vers des formes fibrillaires. Le rôle de la phosphorylation sur l'agrégation de Tau étant toujours débattu, ces résultats permettent de proposer un nouveau rôle pour la phosphorylation dans la formation des oligomères de Tau (Kumar et al., 2014; Tepper et al., 2014).

La toxicité des oligomères de Tau a été démontrée dans des expériences *in vivo*, dans des modèles de souris WT ou surproduisant la protéine Tau humaine. Après injection de ces oligomères préparés *in vitro*, les souris présentent des déficiences synaptiques et mitochondriales ainsi que des troubles de la mémoire (Fá et al., 2016; Lasagna-Reeves et al., 2011).

Néanmoins, l'étude de ces oligomères de Tau reste délicate de par leur hétérogénéité en solution et leur constante évolution au cours du temps. Il est d'ailleurs possible que les oligomères évoluent pendant les expériences et principalement dans les études *in vivo*. De nouveaux outils seront nécessaires dans le futur pour étudier et évaluer l'importance de ces formes oligomériques de Tau dans les processus neurodégénératifs observés dans les tauopathies.

F. Tau et l'hypothèse de sa propagation de type prion

La protéine prion a été découverte en 1982 par Prusiner et ses collaborateurs, au cours de travaux réalisés pour comprendre la maladie de la tremblante du mouton. Ils ont en effet découvert que le principal agent infectieux de cette maladie est uniquement composé de protéines. Ainsi, il a été défini une nouvelle classe d'agents infectieux appelée désormais protéines prions qui, contrairement aux virus ou aux bactéries, sont uniquement composés de protéines dites « infectieuses », capable de se répliquer et d'infecter en absence d'ADN ou d'ARN (Prusiner, 1982).

La maladie de Creutzfeldt-Jakob est la première maladie neurodégénérative à prions découverte chez l'Homme. Cette maladie principalement sporadique se caractérise par la conversion de la protéine prion PrPc dite « normale » en conditions physiologiques, en une protéine pathologique et infectieuse nommée PrPsc formant des agrégats capables d'induire l'agrégation de protéines PrPc saines (Head and Ironside, 2012). Bien que provenant du même gène, et possédant la même structure primaire, ces deux protéines sont structurellement différentes. La protéine PrPc est principalement composée d'hélice α (Zahn et al., 2000) tandis que la protéine PrPsc est organisée en brin β et pourrait s'associer sous forme de trimères, qui lui permettraient de servir de base pour recruter les protéines PrPc (Govaerts et al., 2004).

La maladie à prions est mondialement connue suite au scandale médiatisé des farines animales, au milieu des années 1990. Des patients ont en effet développé une maladie très proche de la maladie de Creutzfeldt-Jakob suite à une consommation de viande bovine nourrie aux farines animales. Les animaux avaient contracté l'encéphalopathie spongiforme bovine, une maladie à prions touchant les bovins. De nombreux travaux scientifiques ont suggéré par la suite que cette transmission s'est ensuite répercutée à l'Homme (Prusiner, 1997).

Pendant de nombreuses années, il était admis que la formation des agrégats de Tau était un processus autonome et indépendant résultant d'une dérégulation d'évènements intracellulaires. Toutefois, le fait que la pathologie Tau suive une progression spatio-temporelle stéréotypée dans certaines maladies neurodégénératives telles que la MA ou la maladie à grains argyrophiles laisse à supposer que les formes toxiques de Tau pourraient se propager via un mécanisme de transfert intercellulaire (Braak and Braak, 1991; Saito et al., 2004).

La propagation de type prion se définit par deux phénomènes : la transmission entre deux cellules de l'espèce pathologique en question (phénomène de propagation également appelé « spreading » en anglais) et le recrutement par l'espèce pathologique de l'espèce saine et sa conversion en espèce pathologique (phénomène de nucléation ou encore de « seeding ») (Figure 21). Les plus récentes études montrent aujourd'hui que les agrégats de Tau sont capables de se propager de cellule en cellule et peuvent recruter la nouvelle Tau intracellulaire et provoquer son agrégation. Ces nouvelles études suggèrent fortement que Tau pourrait adopter un comportement de type prion en conditions pathologiques (Mudher et al., 2017).

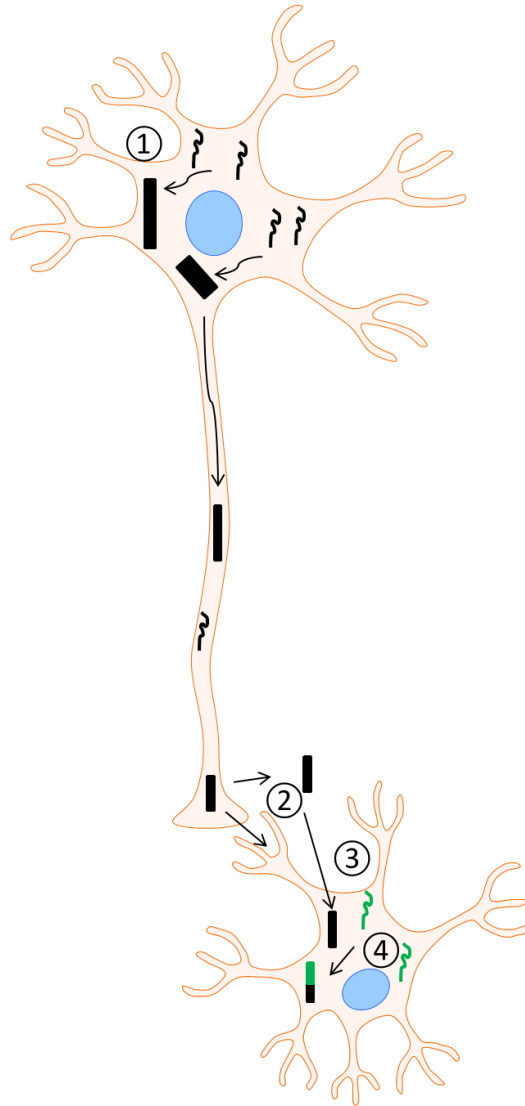


Figure 21 : Modèle de la propagation de type prion pour la protéine Tau. ① Sous l'influence de différents facteurs (mutations, MPTs, ...) Tau s'agrège en conditions pathologiques. ② La protéine Tau agrégée est par la suite sécrétée dans le milieu extracellulaire puis ③ internalisée par la cellule receveuse. ④ Tau sous forme pathologique est capable de recruter la Tau endogène et d'induire son agrégation.

i. La propagation intercellulaire de Tau

Tau est une protéine majoritairement intracellulaire. Néanmoins, Tau peut être sécrétée et observée dans le milieu extracellulaire (Chai et al., 2012; Saman et al., 2012).

Les mécanismes par lesquels les espèces pathologiques de Tau sont sécrétées puis internalisées par de nouvelles cellules restent débattus. Des études ont montré que Tau pouvait se propager via la voie ectosomale (Dujardin et al., 2014a), exosomale (Wang et al., 2017), par un mécanisme de transfert synaptique (Dujardin et al.,

2014b) et par la formation de nanotubes directement entre les cellules (Tardivel et al., 2016) (Figure 22). Une étude récente a également montré que Tau pouvait être secrétée par translocation directe à la membrane plasmique, et que cette sécrétion était augmentée quand Tau était hyperphosphorylée. La translocation de Tau à la membrane serait médiée par des protéoglycanes sulfatés (Katsinelos et al., 2018).

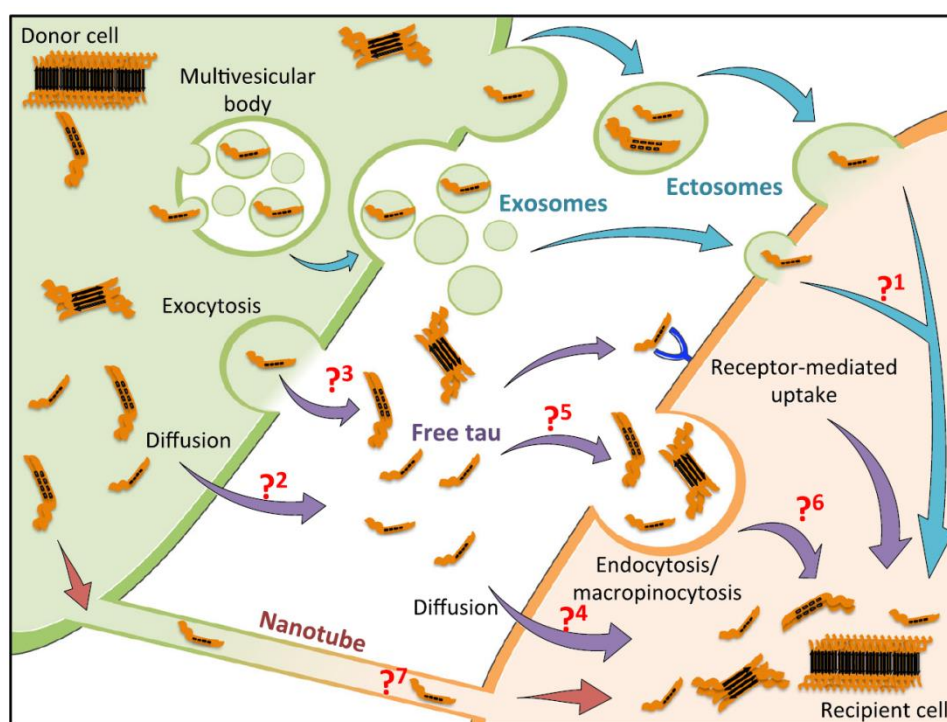


Figure 22 : Les différents mécanismes de propagation proposés pour la protéine Tau. Des questions restent néanmoins en suspens. Quelle est la contribution de chacun de ces mécanismes dans la pathologie ? Existe-t-il un mécanisme préférentiel pour la forme physiologique ou pathologique de Tau ? Adapté de (Mudher et al., 2017).

ii. Internalisation de Tau et phénomène de nucléation

Les mécanismes par lesquels Tau sous forme libre ou agrégée entre dans les cellules restent méconnus. Toutefois, des études ont notamment montré que Tau pouvait être internalisée par macropinocytose (Falcon et al., 2015) (Figure 22) et que cette internalisation serait médiée par les héparanes sulfates présents dans la matrice extracellulaire (Holmes et al., 2013; Stopschinski et al., 2018). Nobuhara et ses collaborateurs ont montré que des anticorps ciblant le domaine N-ter de Tau permettent d'inhiber de façon plus importante son internalisation, ce qui suggère un

rôle important du domaine N-ter dans le processus d'internalisation (Nobuhara et al., 2017).

En revanche de nombreuses études dans des modèles cellulaires et *in vivo* ont montré le potentiel de nucléation de la protéine Tau, que ce soit sous sa forme agrégée par de l'héparine (Frost et al., 2009; Holmes et al., 2014; Kfoury et al., 2012), dans une transition de phase liquide-liquide (Wegmann et al., 2018), provenant d'homogénats de cerveau de souris (Clavaguera et al., 2009) ou de patients atteints d'une tauopathie (Clavaguera et al., 2013) et plus surprenant encore sous sa forme libre WT (Michel et al., 2014).

De manière intéressante, la délétion des motifs PHF6* et PHF6 de Tau supprime également son potentiel de nucléation, montrant le rôle essentiel de ces deux motifs dans ce processus (Falcon et al., 2015). De plus, Mirbaha et ses collaborateurs ont par la suite caractérisé la forme monomérique de Tau capable de recruter et de provoquer l'agrégation de la Tau endogène. Ils ont suggéré que, contrairement à la forme monomérique dite « normale » de Tau où les motifs PHFs seraient très peu accessibles au solvant, les motifs PHFs d'une Tau pathologique seraient beaucoup plus exposés et pourraient ainsi servir de « plateforme » pour recruter la Tau endogène (Mirbaha et al., 2018).

IV. Les thérapies ciblant la protéine Tau

Actuellement, il n'existe malheureusement aucun traitement efficace pour lutter contre la maladie d'Alzheimer et les autres tauopathies. Les seuls médicaments disponibles aujourd'hui pour les patients sont des inhibiteurs d'acétylcholine estérases. Ils permettent de traiter les symptômes, mais ne sont en aucun cas curatifs. Dans cette partie, nous décrivons les différentes stratégies thérapeutiques qui ont été imaginées et mises en place mais également les échecs d'une grande partie de ces thérapies et les espoirs portés par d'autres.

Nous avons pu voir dans la partie précédente les différents facteurs potentiellement impliqués dans l'agrégation et la toxicité exercée par Tau en conditions pathologiques. Suite à ces études, différentes stratégies thérapeutiques ont donc été

envisagées pour évaluer leur efficacité dans le traitement des tauopathies (Figure 23). Bien que certaines de ces thérapies se soient révélées inefficaces, certaines sont toujours en essai clinique. Nous présenterons dans cette partie les différentes approches qui ont été imaginées et celles actuellement en cours pour tenter de réduire la pathologie Tau dans la MA et les autres tauopathies.

A. Les différentes stratégies thérapeutiques

i. Réduction de la phosphorylation de Tau

Tau est hyperphosphorylée dans les PHFs (Grundke-Iqbal et al., 1986) et une dérégulation de sa phosphorylation a été l'une des premières hypothèses proposées pour expliquer son agrégation (Alonso et al., 2001). Une des stratégies thérapeutiques envisagées a donc été de diminuer la phosphorylation de Tau pour réduire sa toxicité et son agrégation.

La première stratégie a été de cibler les kinases directement impliquées dans la phosphorylation de Tau telle que la protéine kinase GSK-3 β , que nous avons précédemment décrite comme potentiellement impliquée dans la phosphorylation pathologique de Tau (Liu et al., 2007).

Un inhibiteur de cette enzyme appelé tideglusib a été développé. Cet inhibiteur a montré des effets bénéfiques dans des modèles transgéniques de souris en réduisant la phosphorylation de Tau mais également le nombre de plaques A β , la mort neuronale et le déclin cognitif associé (Serenó et al., 2009). Suite à ces résultats, des essais cliniques ont été poursuivis. Le premier essai clinique en phase I a montré une diminution des déficits cognitifs sur une petite cohorte de patients atteints de la MA (del Ser et al., 2013). Néanmoins, ces améliorations n'ont pas été confirmées par la suite en phase II, sur une cohorte plus importante (Lovestone et al., 2015).

Le chlorure de lithium, un autre inhibiteur de la GSK-3 β , a également été étudié. Dans des modèles de souris transgéniques, le chlorure de lithium diminue le niveau de phosphorylation de Tau et le développement des NFTs (Leroy et al., 2010; Noble et al., 2005) et réduit l'accumulation d'A β (Su et al., 2004; Yu et al., 2012). Les premiers résultats en phase clinique sont encourageants. Sur de petites cohortes de

patients, il a été observé une diminution du niveau de phosphorylation de Tau dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), et une stabilisation ou une amélioration de certaines performances cognitives (Forlenza et al., 2011; Nunes et al., 2013). De nouveaux essais sont maintenant en cours de préparation (Congdon and Sigurdsson, 2018).

Une autre possibilité pour réduire la phosphorylation de Tau est d'augmenter l'activité de certaines phosphatases et notamment la protéine phosphatase PP2A. PP2A est une phosphatase dont le niveau d'expression est réduit dans la MA (Sontag et al., 2004). Cette enzyme représente plus de 70 % de l'activité totale de déphosphorylation de la protéine Tau, ce qui suggère que la dérégulation de son activité est importante dans la MA (Liu et al., 2005).

Le sélénite de sodium est une molécule qui, en se fixant à une des sous-unités de la PP2A, permet d'augmenter son activité phosphatase. Ce composé a montré des effets bénéfiques sur la pathologie Tau et le déclin cognitif dans des modèles de souris transgéniques (Corcoran et al., 2010; van Eersel et al., 2010). Cependant aucun effet bénéfique n'a été relevé en phase II pour le traitement de la MA (Malpas et al., 2016).

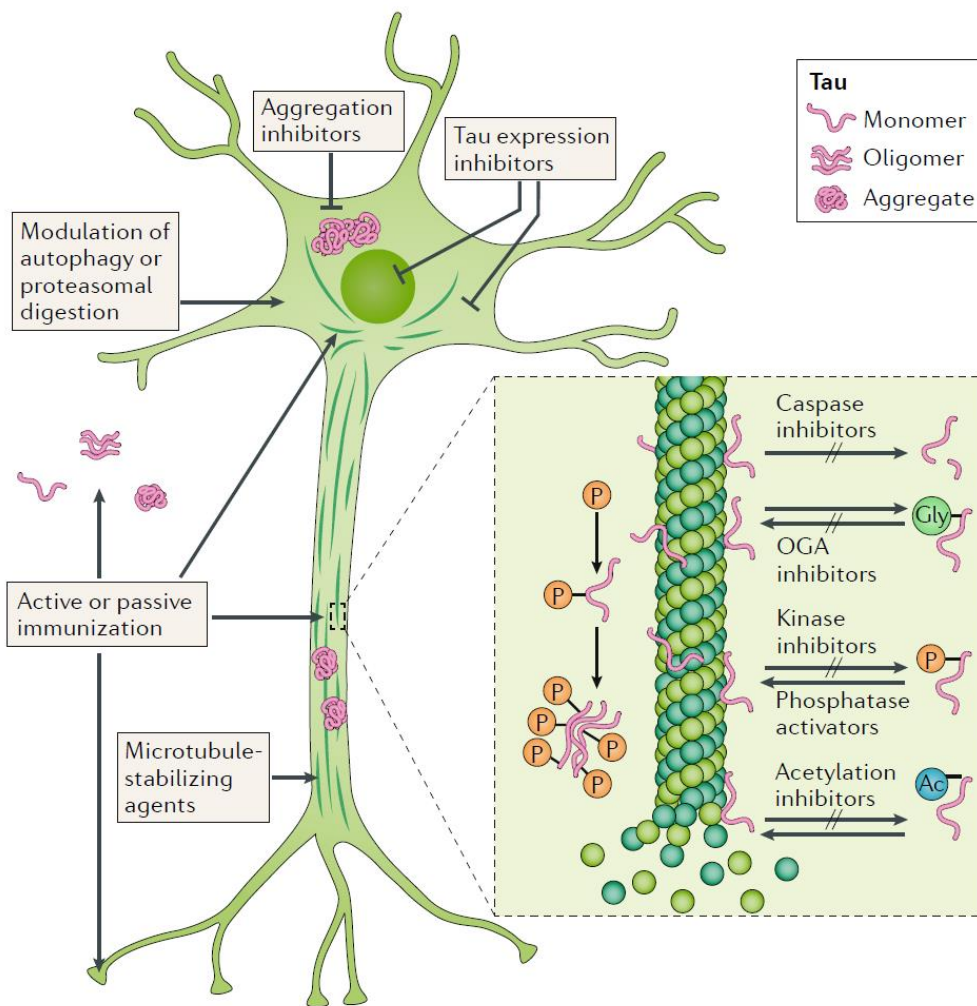


Figure 23 : Les différentes stratégies thérapeutiques qui ont été développées pour cibler la protéine Tau (Congdon and Sigurdsson, 2018).

ii. Inhibition d'autres modifications post-traductionnelles

L'acétylation est la deuxième MPT la plus décrite pour la protéine Tau et certaines ont été décrites comme potentiellement toxiques (Cohen et al., 2011; Min et al., 2015). Certaines molécules ont notamment été développées pour inhiber l'action de certaines acétylases. Une de ces molécules, le salsalate, est capable d'inhiber l'acétylation de la lysine 174 par la protéine p300 et est associée à une diminution du déclin cognitif *in vivo* (Min et al., 2015). Une première étude clinique en phase I sur une cohorte de patients atteints de la PSP a été réalisée mais les résultats n'ont pas encore été publiés.

L'O-GlcNAcétyle est une enzyme dont la fonction est de déglycosyler les protéines, et notamment la protéine Tau. Des études réalisées sur un modèle de souris

développant une tauopathie ont montré qu'une inhibition de cette enzyme permet de réduire la pathologie Tau (Hastings et al., 2017). Une molécule inhibitrice de cette enzyme, appelée MK-8719 est maintenant en phase de développement clinique pour la PSP (Congdon and Sigurdsson, 2018).

iii. Inhibition de l'agrégation de Tau

Une autre stratégie a été de bloquer l'agrégation de Tau pour empêcher la formation des NFTs et ainsi réduire la pathologie. Une des premières molécules utilisées est le bleu de méthylène. Cette molécule inhibe l'agrégation de la Tau *in vitro* (Wischik et al., 1996) et a montré une réduction de la pathologie Tau et des déclin cognitifs associées dans des modèles de souris développant une tauopathie (Melis et al., 2015). Par la suite, des dérivées de cette molécule ont été développés et testés jusqu'en phase III pour la MA. Malheureusement, les résultats n'ont pas montré d'effet bénéfique significatif (Gauthier et al., 2016).

Le curcumin est une molécule naturelle qui, comme le bleu de méthylène, inhibe l'agrégation de Tau *in vitro* et montre une amélioration cognitive dans des modèles *in vivo* (Ma et al., 2013). Cette molécule est allée jusqu'en phase II pour la MA, mais n'a pas montré d'effet bénéfique sur les fonctions cognitives (Congdon and Sigurdsson, 2018).

iv. Les autres stratégies thérapeutiques

D'autres stratégies sont en cours de développement et visent par exemple à augmenter la stabilité des microtubules (Boxer et al., 2014; Magen and Gozes, 2013), ou à réduire l'expression de Tau par l'utilisation d'ARNs interférents (Manczak and Reddy, 2013; Xu et al., 2014).

B. L'immunothérapie anti-Tau

L'immunothérapie ciblant les protéines intrinsèquement non structurées a émergé ces dernières années et représente une nouvelle approche thérapeutique. Les premiers essais immunothérapeutiques ont été réalisés en ciblant le peptide A β car il était considéré comme l'élément déclencheur de la MA d'après l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy and Higgins, 1992). De nombreuses études ont montré

qu'une immunisation ciblant les agrégats constitués de peptides A β réduisait le nombre de plaques A β dans les cerveaux de souris (Bard et al., 2000; Schenk et al., 1999) et diminuait le déclin cognitif dans un modèle transgénique de souris Alzheimer qui produit uniquement des plaques A β (Janus et al., 2000; Morgan et al., 2000). Des essais cliniques ont été réalisés mais ont dû être arrêtés pour cause de toxicité (Orgogozo et al., 2003) ou d'inefficacité (Doody et al., 2014; Salloway et al., 2014). Il est également probable que les patients inclus dans les cohortes soient déjà à un stade trop avancé de la maladie pour permettre de voir un effet bénéfique (Congdon and Sigurdsson, 2018).

Bien que d'autres essais soient actuellement en cours, de nouvelles études se sont ensuite concentrées sur la protéine Tau. En partie du fait que la MA n'est pas la seule tauopathie, mais également parce que la sévérité des déclin cognitifs est corrélée avec le nombre de NFTs, sans pour autant exclure le rôle important que la pathologie A β doit jouer dans la MA (Nelson et al., 2012; Schwarz et al., 2016). Ces résultats suggèrent qu'une réduction de la pathologie Tau est également essentielle au rétablissement des fonctions cognitives chez les patients atteints de la MA. De plus, le fait que Tau puisse se propager de cellule en cellule en adoptant un comportement de type prion permet une approche thérapeutique différente. L'immunothérapie anti-Tau pourrait être adaptée pour cibler les formes extracellulaires de Tau et ainsi ralentir la progression de la pathologie (Figure 23).

Les résultats des études précliniques sont pour le moment prometteurs. Les études ciblant différents épitopes de Tau avec des anticorps ont montré qu'il était possible de réduire la pathologie Tau et le déclin cognitif dans différents modèles de souris développant une tauopathie (Asuni et al., 2007; Boutajangout et al., 2010; Troquier et al., 2012) mais aussi de réduire la pathologie A β dans un modèle développant les deux aspects de la MA (Dai et al., 2017).

	Clinical Trials	Target epitopes	Status	Target Disease
Active tau-based immunotherapy	AADvac1 (Axon Neuroscience SE) NCT02579252	²⁹⁴ KDNIKHVPGGGS ₃₀₅	Phase II	AD
	ACI-35 (AC Immune AG)	³⁹³ VYKpSPVVSgDTpSPRHL ₄₀₈	Phase Ib	AD
Passive tau-based Immunotherapy	C2N-8E12 (C2N Diagnostics) NCT02880956 NCT02985879	²⁵ DQGGYT ₃₀	Phase II	AD, PSP
	BMS-986168 (Bristol-Myers Squibb Company) NCT03068468	⁹ EVMEDHAGTY ₁₈	Phase II	PSP
	RO7105705 (AC Immune SA, Genentech, and Hoffmann-La Roche) NCT02820896 NCT02985879	⁴⁰⁹ pS	Phase I	AD
	LY3303560 (Eli Lilly) NCT02754830 NCT03019536	Conformational epitope	Phase I	AD
	JNJ-63733657 (Janssen Pharmaceuticals) NCT03375697	Middle region of Tau	Phase I	AD
	UCB0107 (UCB Biopharma) NCT03464227	²³⁵ SPSSAKSRLQTA ₂₄₆	Phase I	AD

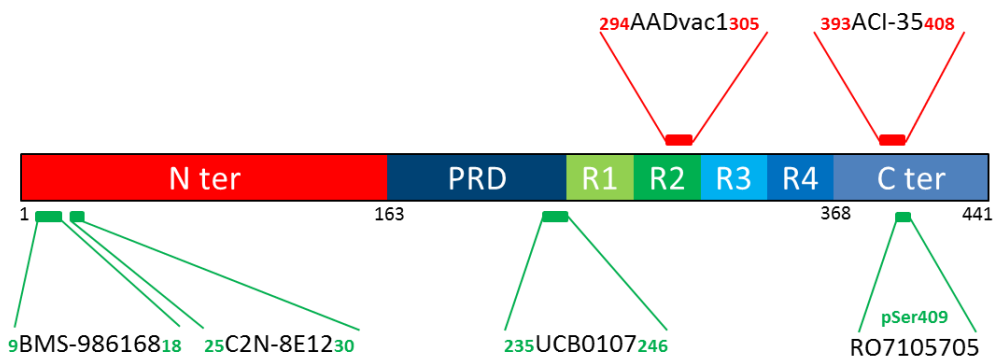


Figure 24 : Essais cliniques en immunothérapie active et passive dirigés contre la protéine Tau. Les épitopes de Tau ciblés sont également annotés

Des essais cliniques en immunothérapie active et passive ciblant la protéine Tau chez des patients atteints de la MA et de la PSP sont actuellement en cours (Figure 24). Le choix de l'épitope semble être un paramètre essentiel car les mécanismes ciblés par les différents anticorps générés sont très probablement différents. Des études récentes ont montré par exemple que l'utilisation d'anticorps dirigés contre la région N-ter de Tau permet de bloquer son internalisation ainsi que son transfert entre les neurones (Nobuhara et al., 2017) et peut réduire l'accumulation de Tau dans un

modèle de souris développant une tauopathie (Spencer et al., 2018). A l'inverse, l'anticorps développé par UCB Biopharma, actuellement en essai clinique de phase I, est dirigé contre un épitope localisé au niveau du PRD (Figure 24). Cet anticorps a démontré qu'il était capable non seulement d'inhiber l'agrégation *in vitro* de Tau induite par de l'héparine (données du laboratoire), mais également de bloquer le phénomène de « seeding » de Tau dans un modèle cellulaire (Courade et al., 2018).

Les essais cliniques pour l'immunothérapie anti-Tau sont récents. Les premiers résultats sont attendus d'ici quelques années. Ces résultats détermineront si cette méthode est concluante et permettront le cas échéant de comprendre le mécanisme à cibler pour que le traitement soit le plus efficace possible.

V. Les anticorps à domaine unique ou VHHs

A. Origine des anticorps à domaine unique

C'est en 1989, lors de travaux pratiques réalisés par des étudiants à l'Université de Bruxelles en Belgique, que fut découvert des anticorps particuliers présents dans le sérum provenant d'un chameau (Pain et al., 2015). Trois types d'anticorps ont été identifiés dans le sérum de cet animal :

- Les Immunoglobuline G de type 1 (IgG1) qui présentent toutes les caractéristiques des IgGs conventionnelles. Elles sont constituées de 2 chaînes dites « lourdes » composées de 4 domaines (VH, CH1, CH2 et CH3) liées à deux chaînes dites « légères » composées de 2 domaines (CL et VL). Les domaines variables VH et VL constituent ensemble le domaine de reconnaissance capable de se lier à l'antigène (Figure 25).
- Contrairement aux IgGs I, les IgG de type 2 et 3 (IgG2 et IgG3) ont une masse moléculaire moins importante car elles sont dépourvues des chaînes légères (CL et VL) et du domaine CH1. Elles sont en effet constituées d'un unique domaine variable appelé VHHs (pour « Variable Heavy Chain of the Heavy chain only antibody ») qui est la plus petite unité suffisante pour la reconnaissance de l'antigène (Figure 25) (Hamers-Casterman et al., 1993). La

seule différence retrouvée entre les IgG2 et 3 est la longueur du segment qui relie le domaine VHH au domaine CH2 du fragment Fc (Figure 25). Ces anticorps sont nommés anticorps à chaîne lourde unique (HCAbs).

D'autres espèces appartenant à la famille des *Camelidae* telles que les lamas ou les dromadaires possèdent ces HCAbs. Leur proportion dans le sérum de ces animaux varie en fonction de chaque espèce. Les HCAbs représentent environ 50 % des IgGs chez le dromadaire et le chameau (Hamers-Casterman et al., 1993) et entre 25 et 45 % chez le lama (van der Linden et al., 2000). Des HCAbs ont également été découverts chez certaines espèces de requin. De façon similaire, ces anticorps appelés Ig-NAR (pour « Immunoglobulin New Antigen Receptor ») sont également dépourvus de chaînes légères et possèdent un seul domaine appelé V-NAR capable de reconnaître son antigène (Greenberg et al., 1995). Toutefois, des études phylogéniques ont montré que les séquences variables des HCAbs IgG2, IgG3 et des Ig-NAR sont très différentes, ce qui suggère donc que les HCAbs de ces deux familles ont évolué de manière indépendante. Les gènes qui codent pour les HCAbs des *Camelidae* proviennent d'une évolution des gènes codant pour les anticorps conventionnels (Nguyen et al., 2002; Roux et al., 1998). L'origine de ces nouveaux gènes remonte à environ 25 millions d'années alors que les gènes codant pour les Ig-NARs remontent à plus de 220 millions d'années (Flajnik et al., 2011).

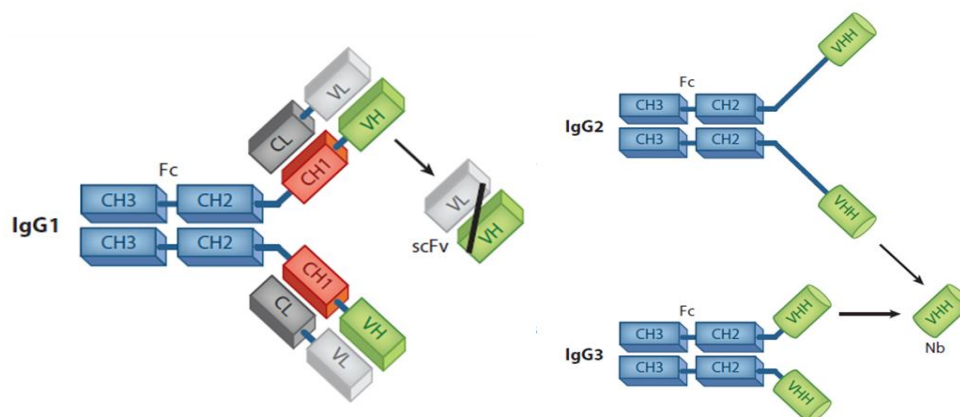


Figure 25 : Représentation des différents types d'anticorps observés chez les Camelidae (Muyldermans, 2013).

B. Structure et propriétés des VHHs

Le domaine de la chaîne lourde constituant le domaine de reconnaissance de l'antigène pour les IgG2 et IgG3 est également appelée anticorps à domaine unique, nanobody ou VHH. Le domaine VH est le nom utilisé pour la chaîne lourde variable présente dans les anticorps conventionnels.

Afin de créer des anticorps plus courts, différentes constructions effectuées à partir des anticorps conventionnels ont été développées telles que les « single-chain variable fragment » (scFv), constitué des domaines VH et VL (Figure 1). Cependant, suite à la découverte des HCAbs, le domaine VHH est aujourd'hui la plus petite entité connue capable de reconnaître un antigène. C'est pourquoi elle présente des propriétés structurales et fonctionnelles intéressantes.

i. Caractéristiques et différences structurales entre les domaines

VH et VHH

Les VHs et VHHs présentent une homologie importante avec notamment plus de 80 % d'identité de séquence dans certains cas (Vu et al., 1997). L'organisation structurale d'un VHH est par conséquent proche du domaine VH. Ils sont tous deux constitués de 4 régions constantes appelées « Framework » (FR) et de 3 boucles variables appelées « Complementary Determining Region » (CDR) (Figure 26a). Les régions FR représentent le cœur de la structure du VHH et du VH. Ils sont composés de 9 brins β , interconnectés par des boucles. L'ensemble de cette structure est également maintenu par un pont disulfure localisé entre les régions FR1 et FR3. Les CDRs quant à eux correspondent aux boucles variables indispensables pour la reconnaissance des antigènes (Figure 26b), le CDR3 étant la boucle variable majoritairement impliquée dans la reconnaissance de l'épitope (De Genst et al., 2005).

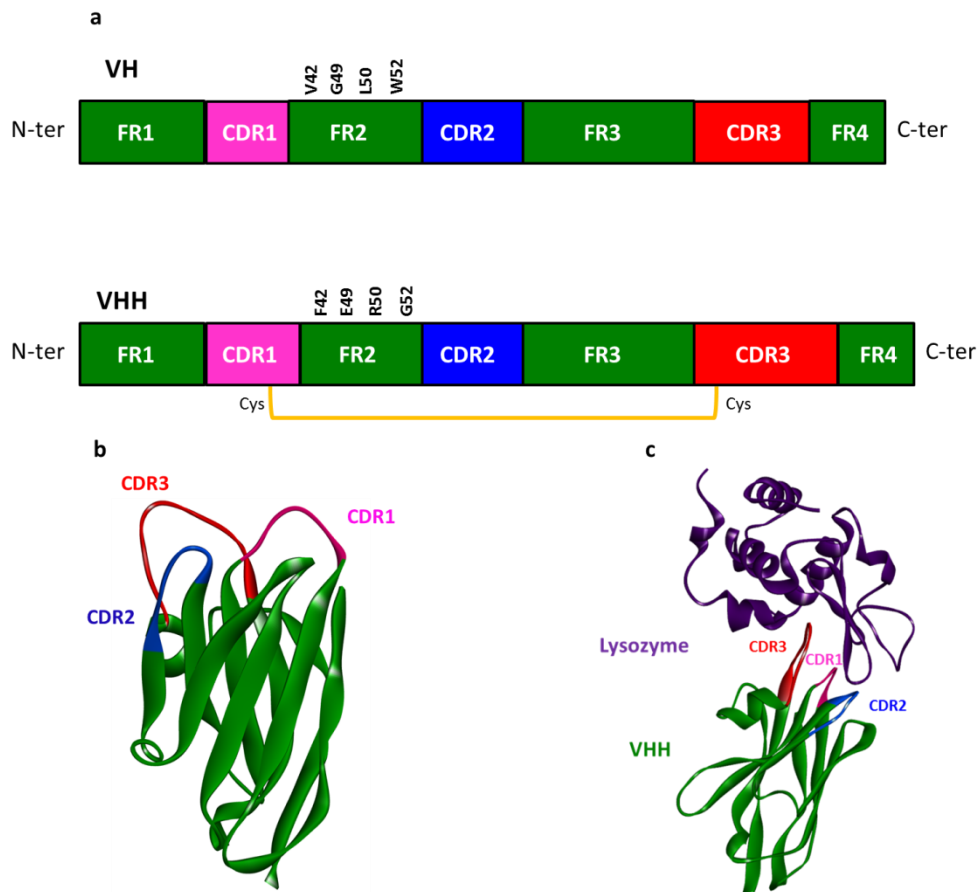


Figure 26 : a : Structure des domaines VH et VHH. b : Structure tridimensionnelle d'un VHH. c : Structure tridimensionnelle du lysozyme en interaction avec le VHH (Code PDB : 1MEL).

Malgré une très forte homologie, des différences structurales sont toutefois observées pour les VHHs, leur conférant des propriétés particulières.

Quatre acides aminés à caractère hydrophobe et très conservés chez les VHs sont substitués par des acides aminés plus hydrophiles au niveau du domaine FR2 chez les VHHs (Figure 26a). Le domaine FR2 du VH interagit avec le domaine VL dans un anticorps conventionnel. Sans interaction avec le VL, le domaine FR est exposé au solvant. La substitution de ces résidus permet donc d'augmenter la solubilité du VHH (Chothia et al., 1985; Muyldermans et al., 1994).

Des différences sont également observées au niveau des CDR1 et 3 (Figure 26a). Les CDR3 sont en moyenne plus longs pour le VHH (16 à 18 acides aminés) (Nguyen et al., 2000; Vu et al., 1997) par rapport au VH (9 à 12 acides aminés selon l'espèce) (Wu et al., 1993). L'augmentation de la taille des CDRs permettrait de compenser l'absence des CDRs du VL retrouvés dans les anticorps conventionnels et ainsi de fournir une

interface antigénique similaire (De Genst et al., 2006). De plus, les CDRs du VHH sont capables d'adopter une plus grande variété de conformation et donc d'avoir accès à une plus grande diversité d'épitopes, dont certains sont inaccessibles pour des anticorps conventionnels (De Genst et al., 2006; Decanniere et al., 2000; Desmyter et al., 2002; Mitchell and Colwell, 2018).

Enfin, un deuxième pont disulfure, généralement localisé entre le CDR1 et le CDR3 est également retrouvé pour les VHHs (Conrath et al., 2003). Ce pont disulfure permettrait de réduire la flexibilité du CDR3 afin de maintenir une interaction forte avec son antigène (Govaert et al., 2012). De manière intéressante, les VHHs retrouvés chez le lama ont une probabilité plus faible d'avoir un deuxième pont disulfure mais ils possèdent en moyenne des CDR3 plus courts (15 acides aminés en moyenne) (Vu et al., 1997). Cet équilibre entre flexibilité/rigidité est essentiel pour maintenir une diversité très importante des épitopes reconnus, tout en gardant une affinité importante pour l'interaction (Muyldermans, 2013).

ii. Génération et sélection des VHHs

La méthode de phage display est une des techniques les plus utilisées pour sélectionner des VHHs spécifiques (Figure 27). Les VHHs sont générés en réalisant une immunisation avec l'antigène d'intérêt sur une espèce appartenant à la famille des *Camelidae*. Suite à cette immunisation, les lymphocytes provenant du sang périphérique sont isolés. Les ARNm sont extraits puis une RT-PCR est réalisée pour obtenir les ADN complémentaires (ADNc). Les ADNc codants pour les VHHs sont identifiés par PCR puis clonés dans des vecteurs de type phagemide, pour permettre leur expression au niveau de la protéine M13, qui est une protéine de surface formant l'enveloppe du phage. Grâce à ce système, les phages présentent à leur surface externe le VHH. Les phages sont passés sur une puce sur laquelle l'antigène d'intérêt est immobilisé. Les phages positifs sont ensuite utilisés pour infecter une souche recombinante de *Escherichia coli*. Ce cycle est répété deux à trois fois dans le but de sélectionner les VHHs les plus spécifiques et affins possible (Vincke et al., 2012) (Figure 27).

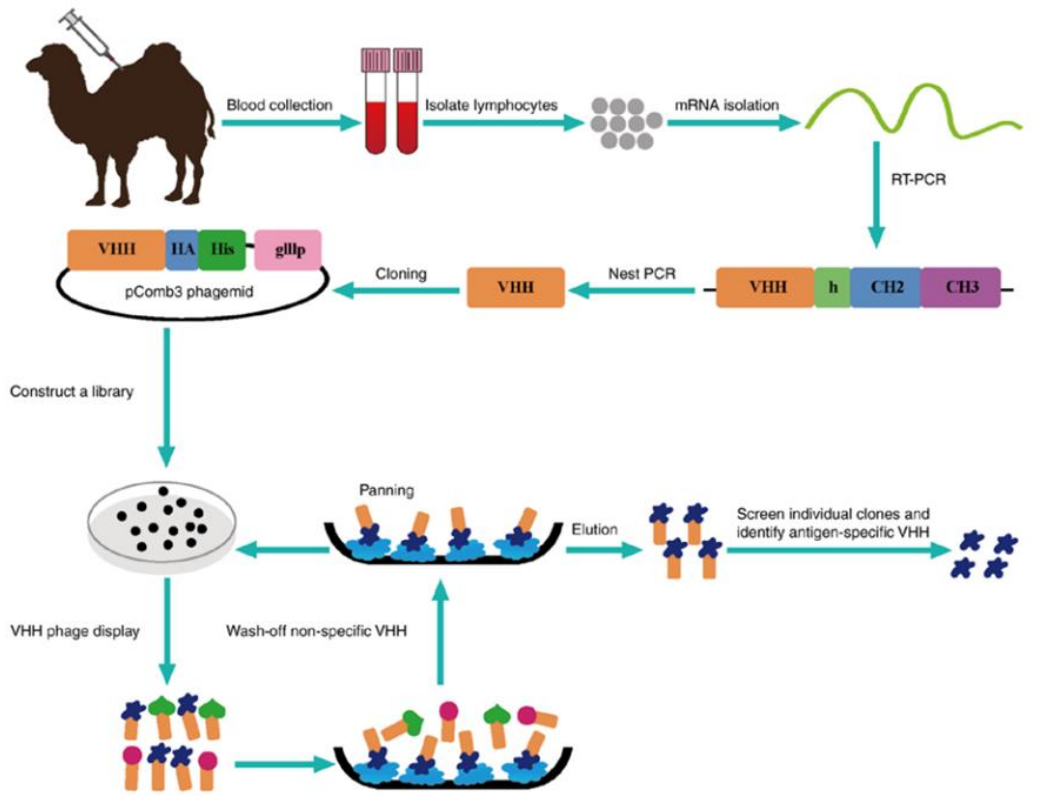


Figure 27 : Protocol général de génération et de sélection des VHHs (Wan et al., 2018).

Néanmoins la génération de VHHs par immunisation peut présenter certains inconvénients. Pour un antigène d'intérêt qui présente une toxicité trop importante, une très faible immunogénicité ou une production en trop faible quantité, l'immunisation peut s'avérer difficile à réaliser. L'utilisation d'une banque de VHH synthétique peut représenter une bonne alternative à ces limitations puisqu'elle ne requiert pas d'immunisation au préalable (Muyldermans, 2001). Ces banques contiennent 100 fois plus de clones ($3 \cdot 10^9$) que les banques réalisées après immunisation ($3 \cdot 10^7$) pour obtenir des VHHs avec une affinité et une spécificité suffisante lors de la sélection (Muyldermans, 2013).

iii. Propriétés biochimiques des VHHs

Les VHHs : des anticorps faciles à produire

De par leur grande taille (150 kDa) et leur complexité, les anticorps monoclonaux utilisés en laboratoire ou pour des applications thérapeutiques sont généralement produits dans des hybridomes. De nombreux efforts ont été réalisés pour améliorer

l'expression dans ce système. Cependant, cela représente un coût important et les méthodes de purification ne sont pas toujours applicables. L'élution à l'acide après fixation sur une colonne d'affinité à la protéine A peut dans certains cas réduire voire abolir l'activité des anticorps produits. A l'inverse, les VHHs sélectionnés par phage display peuvent être facilement produits dans des souches recombinantes bactériennes de type *E. coli* et à moindre coût. Les ADNc codants pour les VHHs d'intérêts peuvent être insérés dans un vecteur permettant l'expression dans le périplasme ou favorisant la formation de ponts disulfures dans le cytoplasme. Ils sont généralement purifiés à l'aide d'une étiquette histidine sur une colonne d'affinité au nickel et les rendements peuvent atteindre des dizaines de mg par litre de culture bactérienne (Arbabi-Ghahroudi et al., 2005).

Les VHHs : des anticorps extrêmement stables

De nombreuses études sur la stabilité des VHHs en solution ont été conduites. Les VHHs peuvent être conservés durant plusieurs mois à 4°C ou à -20°C sans perte d'activité (Muyldermans, 2013). Les VHHs sont par ailleurs extrêmement résistants à la température. Ils peuvent notamment être incubés à 37°C pendant plus d'une semaine et préserver l'intégralité de leur activité (Arbabi Ghahroudi et al., 1997). Une autre étude réalisée sur la stabilité des VHHs a montré qu'ils sont généralement dénaturés à une température comprise entre 60 et 80°C et à une concentration de guanidinium comprise entre 2,5 et 3,3M et entre 5,8 et 9 M d'urée (Dumoulin et al., 2002). Certains VHHs ont même été décrits comme étant capable de maintenir une activité à une température de 90°C (van der Linden et al., 1999). Les VHHs sont également très stables après concentration par ultrafiltration à des concentrations de 10 mg/mL (Muyldermans, 2013). De manière intéressante, et en absence ou non de pont disulfure intramoléculaire, les VHHs peuvent dans certains cas être exprimés de façon stable dans le cytoplasme des cellules et exercer leur activité de manière efficace (Li et al., 2016a) (Danis et al., 2018, *in preparation*).

Les VHHs : des anticorps de haute affinité

Un des avantages majeurs des anticorps conventionnels est leur très haute affinité apparente pour leur antigène. De par leur double domaine de reconnaissance (deux unités VH-VL), l'affinité apparente avec leur partenaire est généralement supérieure au nM et plus souvent de l'ordre du pM. De manière intéressante, les VHHs, qui ne comportent qu'un seul domaine, ont également des constantes d'équilibre (KD) de l'ordre du nM voire inférieurs pour leur antigène (Dumoulin et al., 2002).

Les VHHs : des anticorps moins immunogènes

Pour les anticorps conventionnels utilisés dans des études *in vivo* ou en thérapie, la clairance ainsi que la réponse inflammatoire sont des paramètres essentiels à évaluer. Contrairement aux anticorps conventionnels produits en système cellulaire, la production des VHHs en bactéries permet d'éviter la formation de MPTs telles que les glycosylations, qui peuvent être immunogènes (Jefferis, 2005). De plus, de par leur petite taille (environ 13 kDa), leur clairance dans le système sanguin est plus rapide que pour les anticorps conventionnels ce qui peut également permettre de limiter les réactions inflammatoires (Batra et al., 2002; Holliger and Hudson, 2005). Pour diminuer l'immunogénicité d'un VHH, il est aussi possible d'introduire ses CDRs dans un nouveau « corps » composé de régions FRs « humanisés », c'est-à-dire proches des FRs retrouvés dans le domaine VH des IgG d'origine humaine (Moutel et al., 2016). Ces caractéristiques font des VHHs des anticorps faiblement immunogènes très adaptés pour réaliser des études *in vivo* (Cortez-Retamozo et al., 2004; Li et al., 2016a).

Amélioration des propriétés des VHHs par ingénierie moléculaire

Grâce à leur petite taille, il est également beaucoup plus facile d'améliorer les propriétés d'affinité et de stabilité des VHHs. Pour augmenter la stabilité d'un VHH, il est possible d'associer les CDRs à des régions FRs plus robustes (Saerens et al., 2005). Une autre étude a également montré qu'en ajoutant un simple pont disulfure dans les domaines FRs d'un VHH, il était possible d'augmenter sa thermostabilité (Shinozaki et al., 2017). Pour améliorer l'affinité, une des méthodes utilisées consiste à réaliser une nouvelle banque du VHH d'intérêt, contenant des mutations réalisées aléatoirement. Les nouveaux mutants peuvent être par la suite criblés par double

hybride, afin de déterminer les mutants les plus affins (Danis et al., *in preparation*). Enfin, une autre stratégie consiste à fusionner deux VHHs pour augmenter de façon exponentielle l'affinité apparente. Ces nouvelles constructions sont généralement appelés « diabody », et apportent de nouvelles possibilités intéressantes notamment pour le traitement de maladies par immunothérapie. (Els Conrath et al., 2001; Emmerson et al., 2011; Krishnamurthy and Jimeno, 2018). Pour réaliser des études intracellulaires, les VHHs peuvent être optimisés pour pénétrer à l'intérieur des cellules et cibler différents compartiments cellulaires (Herce et al., 2017; Li et al., 2016a).

C. Les VHHs : des outils pour l'étude des interactions protéiques

Les VHHs sont aujourd'hui des outils de choix pour l'étude de nombreux phénomènes biologiques que ce soit dans des systèmes *in vitro* ou dans des modèles animaux. Dans cette partie, nous illustrerons l'utilisation des VHHs dans deux applications majeures : la cristallisation des protéines et l'étude des mécanismes d'agrégation des protéines de type amyloïde.

i. Etude structurale par cristallographie aux rayons X

La cristallographie aux rayons X est, avec la RMN et la cryo-microscopie électronique, une des trois méthodes permettant de résoudre la structure d'une protéine à l'échelle atomique. La résolution de la structure d'une protéine par rayons X passe par plusieurs étapes critiques. Une de ces étapes consiste à réaliser des cristaux de la protéine d'intérêt. Néanmoins, cette expérience relève de l'empirisme car les paramètres de cristallisation d'une protéine dépendent de ses propres propriétés intrinsèques (solubilité, point isoélectrique, masse moléculaire, dynamique...).

Les VHHs sont aujourd'hui de plus en plus utilisés comme outils pour favoriser la cristallisation de protéines d'intérêt (Pardon et al., 2014; Steyaert and Kobilka, 2011). Grâce à leur petite taille et leur faculté à reconnaître une plus grande diversité d'épitopes, les VHHs sont plus adaptés à l'étude structurale que les anticorps conventionnels. La première structure d'un complexe VHH-protéine a été résolue en

1996. Dans cette étude, les auteurs ont développé un VHH dirigé contre le lysozyme et qui se fixe dans la cavité catalytique de l'enzyme via son CDR3 (Figure 26c) (Desmyter et al., 1996). L'utilisation d'un VHH servant de protéine agoniste a permis de résoudre la structure d'un récepteur couplé à la protéine G (RCPG) appelé récepteur adrénergique $\beta 2$ sous une conformation active (Figure 28a) (Søren G. F. Rasmussen et al., 2011). Par la suite, la structure de ce RCPG en complexe avec les trois sous-unités de la protéine G a également été résolue à l'aide d'un VHH qui a permis de favoriser la cristallisation du complexe en se liant aux sous-unités α et β de la protéine G (Figure 28b) (Søren G.F. Rasmussen et al., 2011). Les VHHs ont en effet une fonction de chaperonne et permettent de maintenir l'assemblage multimérique de protéine, favorisant ainsi la cristallisation des complexes. (Figure 28 c,d) (Baranova et al., 2012; Park et al., 2012; Søren G.F. Rasmussen et al., 2011). Une étude très récente a également permis de résoudre la structure du médiateur 23 (MED23), une protéine impliquée dans la régulation de la transcription chez l'Homme. Le VHH utilisé dans cette étude se fixe à l'interface de trois sous-domaines de la protéine, ce qui rigidifie probablement cette région et permet la cristallisation du complexe (Figure 28e) (Monté et al., 2018). Enfin, les VHHs ont également prouvé leur utilité pour réussir à cristalliser certaines formes intermédiaires de protéines amyloïdes afin de pouvoir étudier leurs mécanismes d'agrégation (Figure 28f) (Domanska et al., 2011).

De nombreuses études ont également permis la cristallisation d'anticorps ou de fragments conventionnels (de type Fab) en complexe avec des peptides non phosphorylés ou phosphorylés de Tau (code PDB : 5mp3, 5mp5, 5mo3, 5mp1, 5zia, 5dmg,...). Un fragment d'anticorps Fab en complexe avec le peptide doublement (202, 205) ou triplement phosphorylés (202, 205, 208) AT8 a également été décrit (Code PDB : 5e2v et 5e2w). Des études biochimiques ont montré que l'anticorps anti AT8 reconnaissait avec une affinité trente fois plus importante l'épitope triplement phosphorylés (Malia et al., 2016).

Toutefois, aucune structure cristallographique constituée d'un VHH en complexe avec un peptide de Tau n'a pour le moment été décrite.

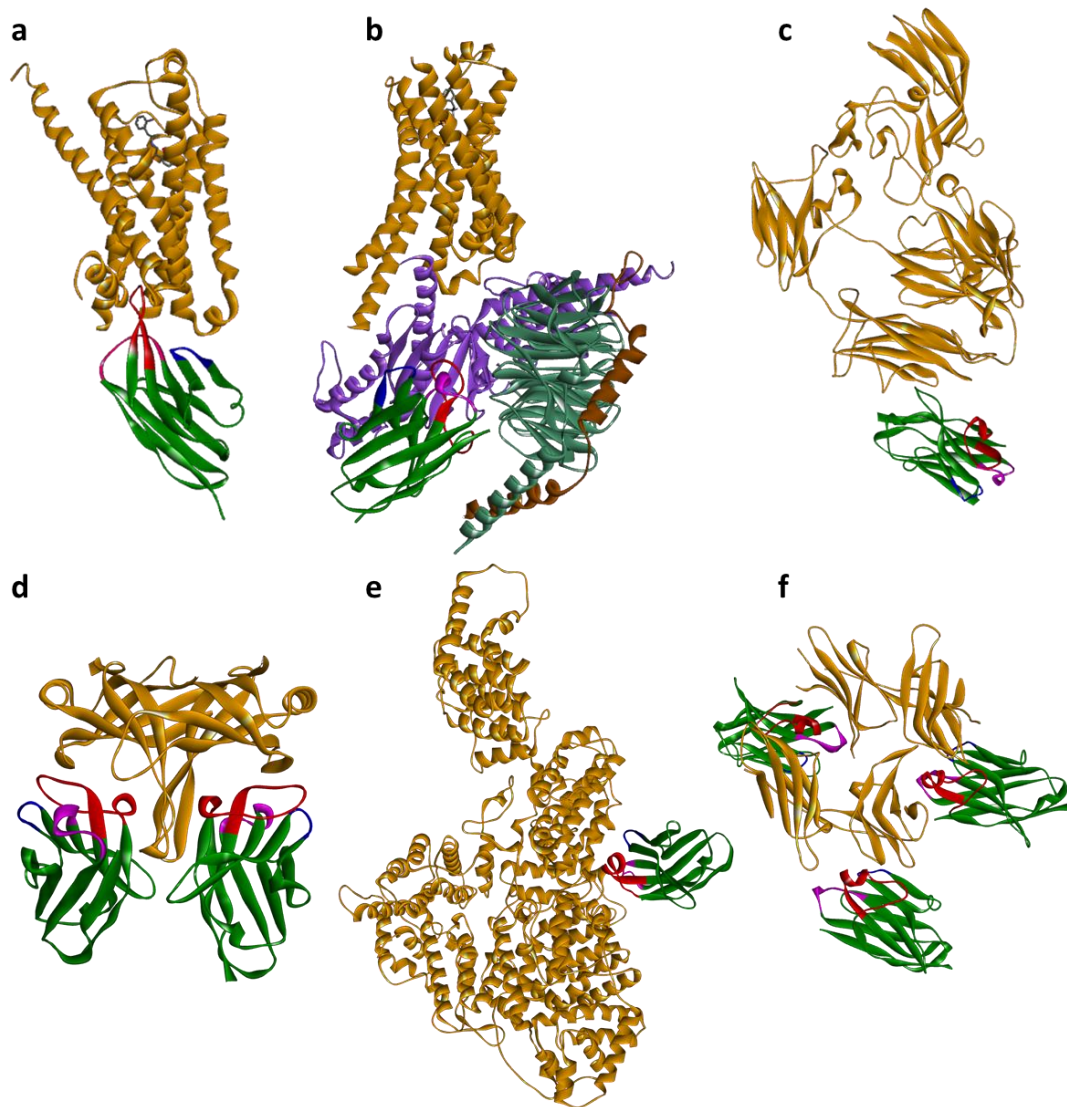


Figure 28 : Différentes structures tridimensionnelles de protéines qui ont été résolues à l'aide de VHHs. a : Structure d'un VHH en complexe avec le récepteur humain adrénérgique $\beta 2$ (code PDB: 3P0G). b : Structure d'un VHH en complexe avec le récepteur $\beta 2$ lié au complexe protéine G (code PDB : 3SN6). c : Structure d'un VHH en complexe avec la protéine SdsB bactérienne (code PDB : 4AQ1). d : Structure de deux VHHs en complexe avec deux sous-unités protéiques du complexe macromoléculaire de transcription de *Trypasonama brucei* (code PDB : 3STB). e : Structure d'un VHH en complexe avec la protéine MED23 (code PDB : 6H02). f : Structure de trois VHHs en complexe avec un fragment de la $\beta 2$ microglobuline humaine sous une forme intermédiaire pro-agrégante (code PDB : 2X89).

ii. Etude des mécanismes d'agrégation des protéines

L'agrégation de Tau ainsi que d'autres protéines dites amyloïdes passe par des mécanismes moléculaires impliquant différentes formes monomériques, dimériques, oligomériques, jusqu'au stade final des formes fibrillaires (Figure 29). L'étude de ces mécanismes reste difficile en raison de la stabilité des différents intermédiaires du processus d'agrégation. Toutefois, les VHHs peuvent se révéler être de formidables outils pour en étudier le mécanisme.

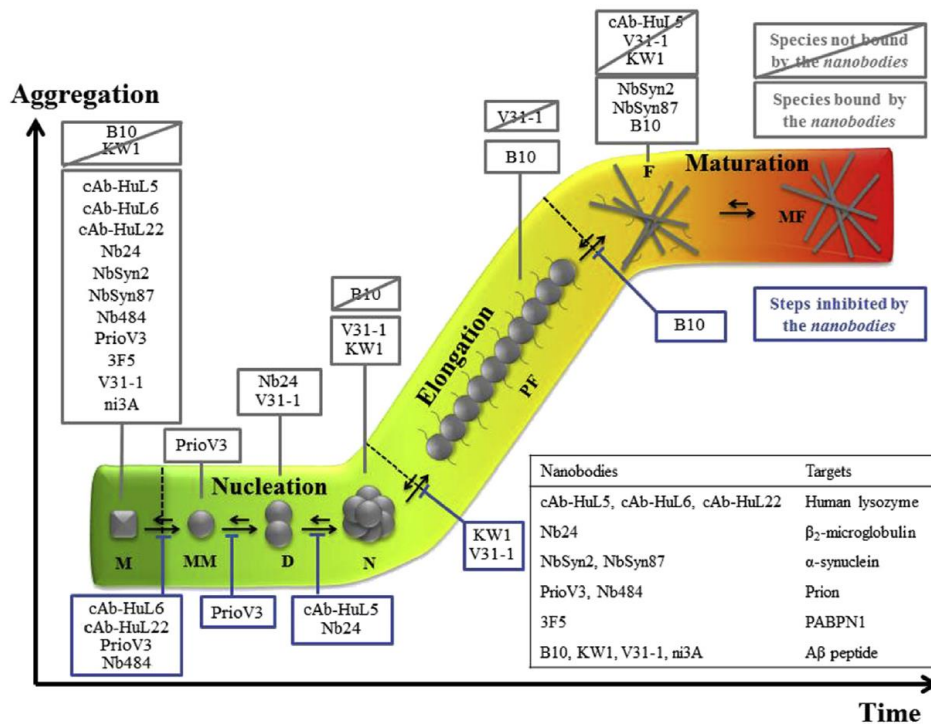


Figure 29 : Schéma résumant les VHHs qui ont été générés contre différentes protéines amyloïdes et qui ciblent différentes espèces intermédiaires participant à leurs processus d'agrégation (Pain et al., 2015).

Une des premières études a été réalisée sur le mécanisme d'agrégation du lysozyme. Le lysozyme est principalement associé à un certain nombre d'amyloïdoses héréditaires (Dumoulin et al., 2006). En conditions pathologiques, le lysozyme s'agrège sous forme fibrillaire et s'accumule dans différents organes (Dumoulin, 2010). Certains mutants identifiés dans ces maladies et produits de manière recombinante sont capables d'agréger spontanément *in vitro* (Booth et al., 1997). En 2003, Dumoulin et ses collaborateurs ont étudié le mécanisme d'agrégation de l'un de ces mutants appelé D67H. Ils ont notamment identifié un VHH capable d'inhiber l'agrégation *in vitro* de ce mutant (Dumoulin et al., 2003) (Figure 30). La résolution de la structure du complexe VHH-lysozyme WT a montré que ce VHH, nommé cAb-

HuL6 dans l'étude, se fixe au niveau d'une région qui a été décrite comme principalement déstabilisée par la mutation D67H (Canet et al., 2002). Cependant, seulement 11 résidus sur 60 impliqués dans l'agrégation de ce mutant sont en contact direct avec le VHH. Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'inhibition de l'agrégation serait plus complexe et ne résulterait pas d'un recouvrement par le VHH de l'interface nécessaire à l'agrégation, mais d'une stabilisation globale de la structure du D67H (Dumoulin et al., 2003).

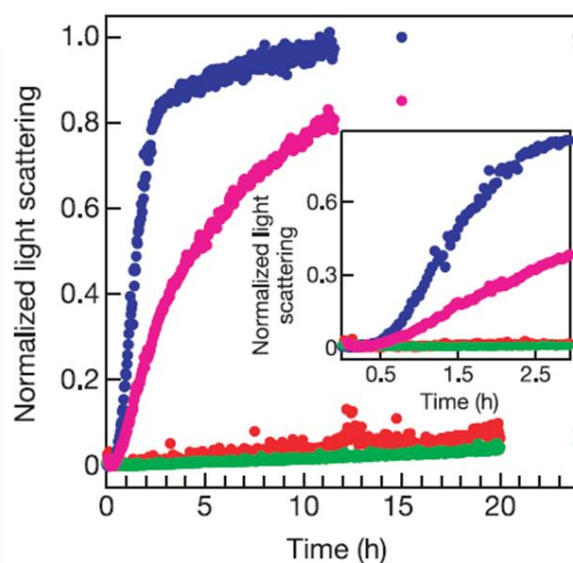


Figure 30 : Suivi par diffusion de lumière du processus d'agrégation du lysozyme sauvage (courbe verte), du mutant D67H (courbe bleue), et du même mutant en présence du VHH Cab-HuL6 à un ratio molaire 1 : 0,5 (courbe rose) et à un ratio molaire 1 : 1 (courbe rouge) (Dumoulin et al., 2003).

A la suite de cette étude, d'autres VHHs dirigés contre le lysozyme mais avec des épitopes reconnus différents ont été développés et ont montré des capacités d'inhibition de l'agrégation de différents mutants (Chan et al., 2008; De Genst et al., 2013). Les VHHs, au regard de leur épitope, peuvent inhiber la formation des fibres amyloïdes en agissant à différents stades du processus d'agrégation (Figure 29).

Plus récemment, les VHHs ont été utilisés pour étudier les mécanismes d'agrégation des protéines amyloïdes impliquées dans les maladies neurodégénératives telles que l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson et le peptide A β dans la MA.

Deux VHHs dirigés contre l' α -synucléine ont notamment été développés contre la forme WT de la protéine et la forme mutée A53T. Ces VHHs, appelés NbSyn2 et

NbSyn87 se fixent au niveau du domaine C-terminal de la protéine (De Genst et al., 2010; Guilliams et al., 2013). Le NbSyn2 n'affecte pas le processus d'agrégation *in vitro* de l' α -synucléine et est capable de se lier aux formes solubles comme aux formes agrégées (Figure 29). Ces résultats suggèrent que le domaine C-terminal de l' α -synucléine n'est pas directement impliqué dans son processus d'agrégation (De Genst et al., 2010).

Différents VHHs dirigés contre des espèces diverses d'A β ont également été développés. De manière intéressante, certains de ces VHHs sont spécifiques d'une forme intermédiaire prise par A β lors du processus d'agrégation (Figure 29). Deux VHHs, appelés B10 et KW1, ont été générés à partir de différentes formes du peptide A β 40. Le VHH B10 est spécifique des formes fibrillaires et est capable d'inhiber la formation des fibres *in vitro* en maintenant le peptide dans un stade protofibrillaire (Figure 31a,c) (Habicht et al., 2007). Contrairement au VHH B10, le VHH KW1 est spécifique des formes oligomériques du peptide A β 40. KW1 inhibe également la formation des fibres *in vitro* en maintenant le peptide A β 40 sous une forme agrégée mais non fibrillaire (Figure 31b,c) (Morgado et al., 2012).

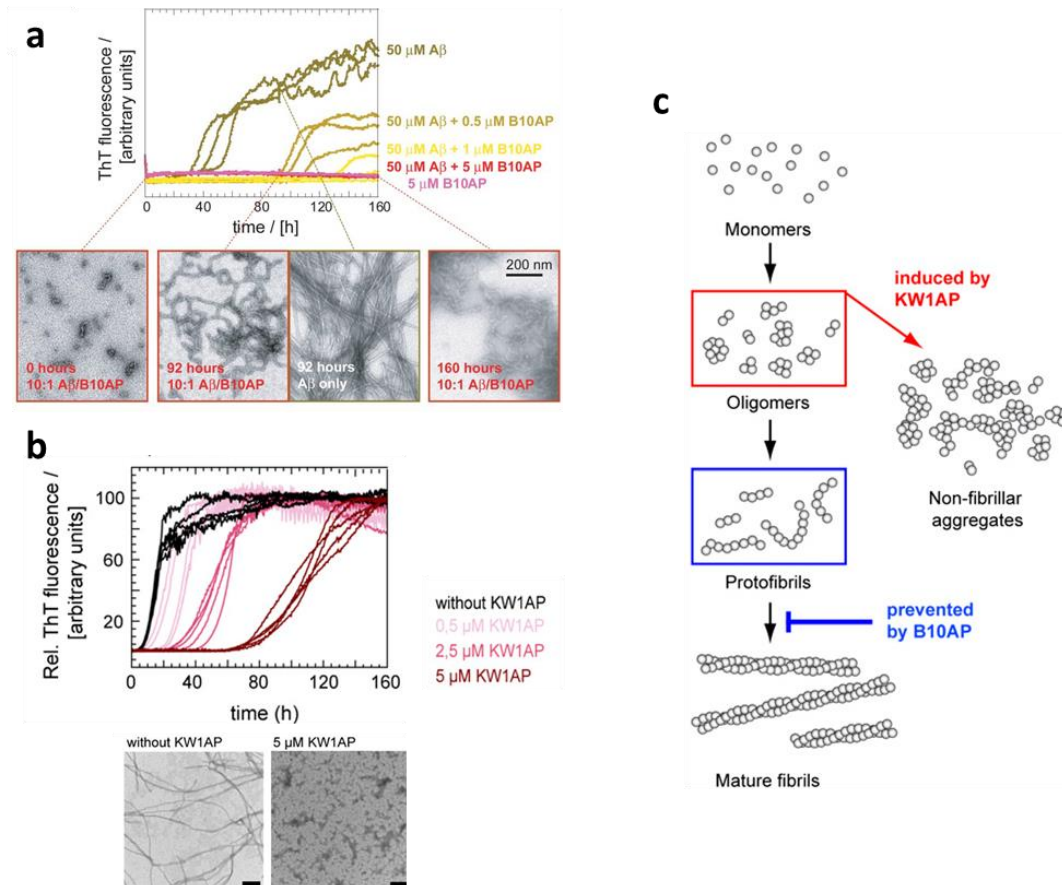


Figure 31 : a : Suivi par fluorescence de la ThT et par microscopie électronique de l'agrégation *in vitro* du peptide A β en présence du VHH B10 (courbe noire) (Habicht et al., 2007). b : Suivi par fluorescence de la ThT et par microscopie électronique de l'agrégation *in vitro* du peptide A β en présence du VHH KW1 (Morgado et al., 2012). c : Schéma du mécanisme d'action des VHHs B10 et KW1 sur le processus d'agrégation du peptide A β (Pain et al., 2015).

Ces études démontrent l'efficacité des VHHs comme outils pour étudier les mécanismes d'agrégation des protéines amyloïdes. Nous avons pu voir qu'il est possible de cibler des états intermédiaires tels que les formes oligomériques d'une protéine amyloïde afin de pouvoir mieux étudier son mécanisme d'agrégation. Enfin les VHHs sont également très efficaces pour maintenir certaines de ces espèces intermédiaires sous une conformation stable permettant par la suite leur étude au niveau moléculaire (Guilliams et al., 2013).

D. Vers une utilisation diagnostique et thérapeutique des VHHs

Outre leur utilisation dans le domaine de la recherche, les VHHs sont maintenant de plus en plus considérés comme une alternative aux anticorps conventionnels en immunothérapie et en diagnostic. L'entreprise pharmaceutique Ablynx® est aujourd'hui la compagnie la plus avancée dans l'utilisation des VHHs en thérapie. Plus de 30 programmes sont en cours de développement avec différents partenaires et ciblent principalement des cancers. Deux de leur VHHs sont actuellement en essai clinique pour traiter la maladie de Moschowitz, une forme grave de microangiopathie thrombotique (Caplacizumab, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02553317) et pour lutter contre l'infection par le virus respiratoire syncytial qui touche les nouveaux nés (ALX-0171, Ablynx, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02979431).

i. L'utilisation des VHHs en oncologie

Depuis maintenant plus d'une trentaine d'années, l'immunothérapie est utilisée pour soigner les cancers. Contrairement aux traitements conventionnels comme la radiothérapie et la chimiothérapie, l'utilisation d'anticorps spécifiques permet de proposer des thérapies ciblées pour mieux lutter contre le développement de différents types de cancers. Certains de ces anticorps sont par ailleurs aujourd'hui disponibles pour soigner certains cancers du sein ainsi que des cancers colorectaux (Oldham and Dillman, 2008). Les anticorps sont également utilisés comme « protéines cargo » d'une molécule ou d'un principe actif, pour permettre son transport et son activation sur sa cible spécifique (Alley et al., 2010). Enfin, des anticorps sont en développement dans le but de détecter différentes tumeurs par imagerie moléculaire (Zhao et al., 2008).

Néanmoins, leur grande taille (plus de 150 kDa) représente parfois un obstacle. La pénétration des anticorps dans les tissus tumoraux est souvent irrégulière et limitée (Minchinton and Tannock, 2006). C'est pourquoi de nombreuses optimisations ont été réalisées pour développer des anticorps plus petits tels que les fragments

« fragment antigen binding » (Fab, 50 kDa) ou scFv (28 kDa) (Gong et al., 2012; Miller et al., 2012).

Dans ce contexte, les VHHs représentent une très bonne alternative aux anticorps conventionnels. De par leurs propriétés, les VHHs sont extrêmement modulables et peuvent être plus facilement modifiés si nécessaire.

Des études ont été réalisées pour évaluer l'effet direct de VHHs dirigés contre les protéines EGFR (pour « epidermal growth factor receptor »), responsables de la croissance et du développement de nombreux type de tumeurs. Un VHH bivalent et monospécifique (2 VHHs fusionnés ciblant le même antigène) ciblant la protéine EGFR a été généré par phage display et inhibe la croissance des tumeurs dans un modèle *in vivo* (Roovers et al., 2011). Une autre étude a montré que des VHHs seraient efficaces pour réduire l'activité de l'anhydrase carbonique, une enzyme impliquée dans la survie des cellules tumorales en conditions hypoxiques. La réduction de l'activité de cette enzyme se traduit par une diminution de la survie des cellules cancéreuses (Araste et al., 2014).

Les VHHs sont majoritairement utilisés comme protéine cargo pour permettre le transport et la livraison d'un composé ou d'une drogue vers sa cible spécifique. Différentes études ont notamment montré qu'il était possible de réduire la croissance tumorale dans un modèle *in vivo* en utilisant un VHH ciblant la protéine oncogène CEA (pour « carcino embryonic antigen ») fusionnée à une β -lactamase, permettant l'activation ciblée de la drogue administrée par la suite (Cortez-Retamozo et al., 2004). Behdani et ses collaborateurs ont développé un VHH dirigé contre la protéine VEGFR2, surexprimée dans les tumeurs, avec l'exotoxine A (eA), qui est un inhibiteur de la traduction. Ils ont pu montrer que cette construction VHH-eA cible de manière spécifique la protéine VEGFR2 et inhibe la prolifération du modèle cellulaire étudié (Behdani et al., 2013).

L'utilisation des nanoparticules est maintenant devenue une des stratégies les plus importantes dans le domaine de la cancérologie. Les nanoparticules permettent d'encapsuler le principe d'intérêt dans une particule sphérique qui peut être composée de liposomes, micelles ou polymères organiques et inorganiques. Ces particules sont ensuite délivrées à la population cellulaire ciblée. Les nanoparticules protègent ainsi la drogue contre sa dégradation, ou peuvent permettre de la

maintenir soluble. L'encapsulation de la drogue permet également de limiter sa toxicité et ainsi de réduire certains effets indésirables. Aujourd'hui, les VHHs sont utilisés dans ces systèmes comme protéines cargo pour transporter ces nanoparticules aux cellules tumorales ciblées, afin de libérer spécifiquement la drogue (Hu et al., 2017). Un groupe de recherche a par ailleurs développé un VHH spécifique de EGFR associé à des nanoparticules liposomales contenant un inhibiteur de IGF-1R (pour « insulin-like growth factor 1 receptor »). IGF-1R est étroitement associé à la cascade de signalisation induite par EGFR dans le mécanisme de résistance tumorale (van der Veecken et al., 2009). De manière intéressante, la nanoparticule résultante permet d'inhiber de façon combinée l'activité de EGFR par le VHH et de IGF-1R par l'inhibiteur. Une forte réduction de la croissance tumorale est également observée dans les modèles cellulaires et *in vivo*, ce qui prouve la robustesse de ce type de système (van der Meel et al., 2013, 2012).

ii. Les VHHs dans les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson sont caractérisées par la formation et l'accumulation d'agrégats protéiques dans le cerveau. Comme nous avons pu le voir précédemment, les VHHs sont de formidables outils pour étudier les mécanismes qui régissent l'agrégation de ces protéines. Nous allons à présent voir que ces VHHs ont également un potentiel important dans le traitement et le diagnostic de ces maladies.

La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) correspond à l'interface entre le système nerveux central (SNC) et la circulation périphérique sanguine et permet de réguler le transport des molécules entre ces deux systèmes. Elle est composée de trois types cellulaires : les cellules endothéliales formant la paroi interne des vaisseaux sanguins, les péricytes qui sont des cellules musculaires lisses pouvant contrôler le diamètre des vaisseaux et enfin les astrocytes qui sont des cellules gliales du SNC et qui font le lien entre la communication sanguine et neuronale (Daneman and Prat, 2015). Grâce à ses propriétés uniques, la BHE permet de protéger le SNC contre l'intrusion de toxines et divers pathogènes.

Néanmoins, cette protection représente également un défi majeur pour le traitement des maladies neurodégénératives, car les molécules thérapeutiques utilisées comme les anticorps doivent également être capables de traverser la BHE pour exercer leur activité. En conditions physiologiques, seulement 0,1% des anticorps traversent la BHE. Toutefois, le pourcentage d'anticorps retrouvé dans le liquide céphalo rachidien (LCR) est plus important pour les patients atteints par certaines maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, suggérant que la BHE est altérée en conditions pathologiques (Bowman et al., 2007).

Les VHHs et la BHE

Afin de proposer des solutions immunothérapeutiques efficaces, des efforts sont réalisés pour améliorer la capacité des anticorps conventionnels à traverser la BHE. Une des solutions alternatives est d'utiliser des VHHs qui, de par leur petite taille et leur modularité, sont facilement optimisés pour traverser la BHE et exercer directement leur activité biologique ou servir de protéines cargo.

En 2002, Muruganandam et ses collaborateurs ont développé une méthode de phage display permettant la sélection directe de VHHs capables de traverser la BHE. Les phages provenant d'une banque synthétique de VHHs sont directement appliqués sur un modèle de cellules endothéliales. Les cellules sont par la suite lysées pour récupérer les phages internalisés qui sont déposés sur un modèle de BHE *in vitro*. Les phages dans le milieu sont récupérés et les VHHs correspondants sont identifiés par séquençage. Cette méthode a permis à l'équipe de sélectionner deux VHHs appelés FC5 et FC44 pour leur capacité à traverser la BHE *in vitro* mais également dans des modèles *in vivo* (Muruganandam et al., 2002). Cette méthode constitue un moyen efficace de sélectionner des VHHs faisant office de protéines cargo pour transporter d'autres composés dans le SNC. Par la suite, cette même équipe a exploré les mécanismes cellulaires qui régissent la capacité du VHH FC5 à traverser la BHE. Les études *in vitro* ont montré que le transport de FC5 se ferait par un mécanisme d'endocytose actif clathrine-dépendant (Abulrob et al., 2005). Différents VHHs ont également montré leur capacité à traverser la BHE de manière intrinsèque. En 2011, Rutgers et ses collaborateurs ont montré que le VHH ni3A, spécifique du peptide A β , est capable de traverser la BHE en conditions *in vitro* et *in*

vivo (Rutgers et al., 2011). En 2016, Li et ses collaborateurs ont sélectionné un VHH dirigé contre la protéine acide fibrillaire gliale (« glial fibrillary acidic protein » ou GFAP), spécifique des astrocytes. Ils ont réalisé différentes constructions incluant le VHH seul, avec ou sans étiquette à caractère acide ou basique, fusionné à une protéine de fluorescence verte (« green fluorescent protein » ou GFP) ou sous forme de diabody. De manière intéressante, les constructions protéiques capables de traverser la BHE et de marquer de manière spécifique les astrocytes ont toutes un point isoélectrique basique supérieur à 9. De plus, le passage de la BHE par les VHHs n'est pas dépendant de la température suggérant un mécanisme passif d'endocytose (Li et al., 2016a).

Les VHHs comme outils diagnostique et thérapeutique

Les VHHs représentent des outils intéressants dans l'étude des maladies neurodégénératives. Comme nous l'avons vu précédemment, différents VHHs ont été utilisés pour étudier les mécanismes d'agrégation de l' α -synucléine et du peptide A β de manière *in vitro*. Mais d'autres VHHs ont également été générés pour étudier certains mécanismes dans des modèles *in vivo*. En 2015, Dorresteyn et ses collaborateurs ont développé des VHHs dirigés contre la β -sécrétase BACE1, responsable du clivage protéolytique de l'APP et de la formation par la suite du peptide A β (Figure 6). Certains VHHs ont été sélectionnés pour leur effet inhibiteur de l'activité enzymatique de BACE1 en conditions *in vitro* et ont été injectés dans un modèle de souris développant une pathologie A β . L'injection du VHH conduit à une réduction significative de la proportion d'A β dans le plasma ainsi que dans le cerveau (Dorresteyn et al., 2015).

A notre connaissance, un seul VHH dirigé contre Tau a été décrit dans la littérature. Ce VHH a été développé en 2016 par Li et ses collaborateurs. Il a été généré en immunisant un alpaga avec des PHFs purifiés à partir d'extraits de cerveaux de patients atteints de la MA et reconnaît spécifiquement un épitope phosphorylé dans le domaine C-ter de Tau. De manière intéressante, ce VHH appelé A2 marque de façon spécifique les NFTs dans un modèle de souris développant une tauopathie de la même façon que l'anticorps AT8, utilisé en routine pour les analyses de coupes de

cerveaux par immunomarquage (Figure 8). Plus encore, A2 détecte spécifiquement les NFTs dans des expériences en temps réel d'imagerie *in vivo* (Li et al., 2016b). Des résultats similaires ont également été obtenus à partir d'un VHH dirigé contre A β (Li et al., 2016b).

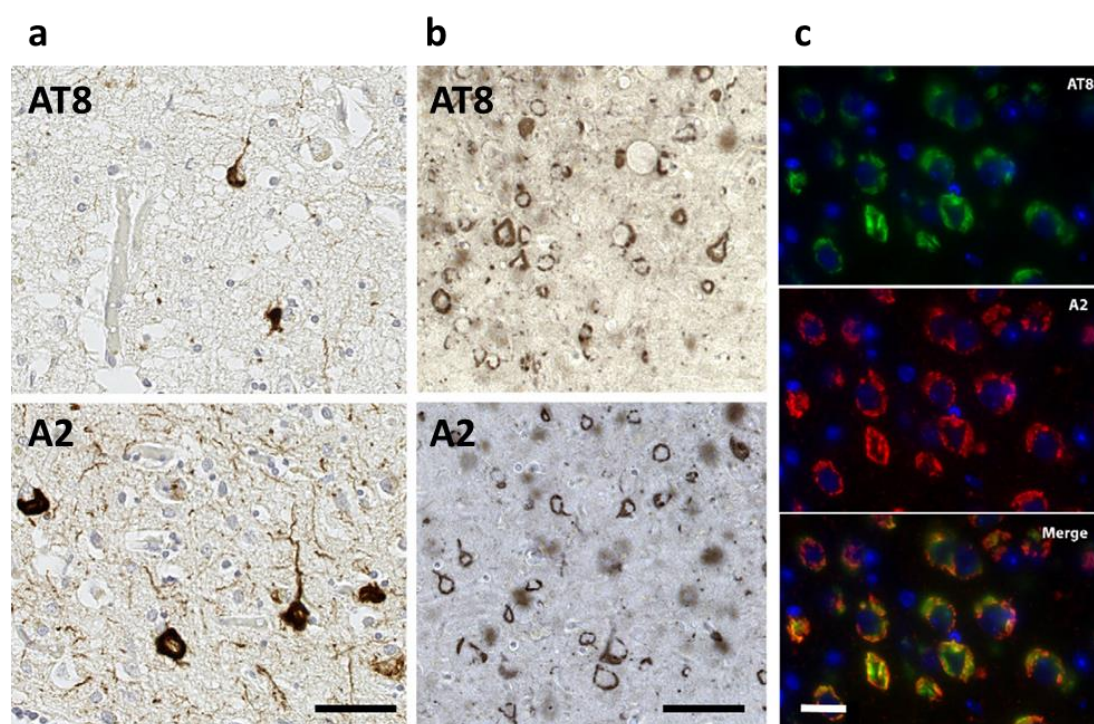


Figure 32 : Révélation par immunomarquage des NFTs retrouvés sur des coupes de cerveaux de patients Alzheimer (a) et de souris transgéniques Tg4510 (b) en utilisant l'anticorps AT8, reconnaissant un épitope doublement phosphorylé de Tau (pS202 pT205) et le VHH A2, reconnaissant un épitope phosphorylé en position C-terminale. c : Double marquage AT8/A2 et révélation par immunofluorescence de coupes de souris transgéniques Tg4510 montrant une forte colocalisation des deux anticorps (Li et al., 2016b).

Les marqueurs développés aujourd'hui pour suivre la pathologie A β et Tau dans la MA par imagerie reposent sur l'utilisation de traceurs PET (pour « Positron-emission tomography») (Clark et al., 2011; Kimura et al., 2015; Maruyama et al., 2013). Néanmoins, certains traceurs PET et notamment ceux développés pour suivre la pathologie Tau ne sont pas encore d'une sensibilité et spécificité optimale. De plus, le coût d'utilisation de ces traceurs est extrêmement élevé. Ces résultats ouvrent la voie vers une utilisation diagnostique de ces VHHs qui pourrait permettre, à moindre coût, de mieux suivre le développement et la progression des NFTs et des plaques A β chez les patients atteints de la MA ainsi que des autres tauopathies dans le futur.

Objectifs de l'étude

Comme nous avons pu le voir, Tau est une protéine intrinsèquement désordonnée et multifonctionnelle car impliquée dans un grand nombre de fonctions biologiques. Tau est également observée dans de nombreuses maladies neurodégénératives regroupées sous le nom de tauopathies et caractérisées par l'accumulation d'agrégats de cette protéine dans les neurones. De plus, l'évolution de ces agrégats corrèle avec l'évolution du déclin cognitif pour certaines de ces tauopathies. Malheureusement, il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour lutter contre ces maladies.

De nombreuses études ont été réalisées pour tenter de comprendre le processus d'agrégation de Tau dans de nombreux modèles. Bien que des progrès aient été réalisés dans la compréhension de ce processus, de nombreux points restent obscurs et, à ce jour, le mécanisme régissant la formation de ces agrégats reste inconnu.

De nombreux travaux ont été réalisés dans différents modèles pour tenter de réduire la formation des agrégats de Tau et une des approches qui semble avoir eu le plus de succès dans cette entreprise est l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre cette protéine. Des essais par immunothérapie ont en effet été réalisés dans des modèles de souris transgéniques et ont montré des effets bénéfiques. Aujourd'hui, plusieurs essais cliniques sont en cours dans l'espoir de proposer les premiers traitements efficaces pour lutter contre ces maladies. Toutefois, l'étude des mécanismes d'agrégation de Tau et de la propagation de la pathologie au sein du cerveau des patients reste essentielle afin de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques dans le futur.

Les anticorps à domaine unique, également appelés VHHs, représentent une très bonne alternative aux anticorps conventionnels pour étudier les mécanismes d'agrégation des protéines amyloïdes mais également en tant qu'outil diagnostique et thérapeutique. Leur petite taille et leur stabilité leur confèrent des propriétés biochimiques intéressantes pour leur utilisation dans différentes expériences *in vitro* et *in vivo*. Ils sont facilement modifiables en utilisant la biologie moléculaire pour leur ajouter de nouvelles propriétés, telles que la capacité de franchir la BHE, de pénétrer à l'intérieur des cellules ou d'améliorer leurs propriétés de spécificité et d'affinité par rapport à leur antigène cible. Récemment, des VHHs ont même

démontré leur potentiel en tant qu'outil de diagnostic dans des expériences *in vivo* pour cibler les plaques A β et la Tau hyperphosphorylée retrouvée dans les NFTs.

C'est dans ce contexte que nous avons décidé de générer, sélectionner et caractériser des VHHs dirigés contre différentes formes de la protéine Tau. Ceci toujours dans le but de comprendre les mécanismes régissant son agrégation, sa propagation entre cellules, et enfin identifier certains VHHs qui pourraient avoir un intérêt thérapeutique ou diagnostique.

En collaboration avec Hybrigenics services, des VHHs dirigés contre la protéine Tau recombinante non modifiée, phosphorylée *in vitro* et agrégée par de l'héparine ont été obtenus. Les VHHs ont été produits *in vitro* et les interactions Tau-VHHs ont été caractérisées par RMN pour déterminer l'épitope et par SPR pour évaluer l'affinité. Par la suite, les VHHs ont été testés dans un test d'agrégation de Tau *in vitro* et sélectionnés pour leur capacité à interférer avec son agrégation. Suite à ces premiers tests et toujours en collaboration avec Hybrigenics service, certains de ces VHHs ont été optimisés pour améliorer leur affinité pour Tau ou pour permettre leur expression intracellulaire. Enfin, les VHHs « anti-agrégants » ont ensuite été exprimés dans un modèle cellulaire d'agrégation de Tau et dans un modèle de souris transgénique afin de confirmer leur effet dans des modèles d'une complexité supérieure.

Résultats

I. Caractérisation biochimique des interactions VHH-Tau

Préambule : génération des VHHs dirigés contre différentes espèces de Tau

Au départ du projet, des VHHs dirigés contre les différentes formes de Tau ont été générés en collaboration avec la société Hybrigenics services. Cette entreprise a récemment participé à la génération d'une banque synthétique de VHHs humanisés codants pour plus de 3 milliards de VHHs différents. Cette banque a été principalement développée par le Dr. Frank Perez de l'Institut Curie à Paris et le Dr. Aurélien Olichon à l'université de Toulouse III (Moutel et al., 2016).

15 VHHs dirigés contre la protéine Tau 2N4R recombinante ont été obtenus. Suivi à une date ultérieure par les VHHs C3-1, G1-1, E4 et E6 (septembre 2017). Un second criblage de la bibliothèque de phages contre de la protéine Tau phosphorylée *in vitro* par de l'extrait de cerveau de rat (Tau-P) s'est également révélé positif et a permis la sélection de 11 clones additionnels. Une contre-sélection a été effectuée de telle sorte que ces clones ne reconnaissent pas la protéine non-phosphorylée. Enfin nous avons ensuite réalisé au laboratoire une agrégation *in vitro* de la protéine Tau préalablement biotinylée et en présence d'héparine. La protéine Tau agrégée a par la suite été utilisée pour un criblage qui a permis la sélection d'un unique clone positif, que nous n'avons pas encore étudié. Leur capacité à reconnaître la protéine Tau a été validée en première étape par la technique d'ELISA. Les différents clones ont été par la suite insérés dans un vecteur pHEN2 permettant l'expression périplasmique du VHH en fusion avec une étiquette histidine et trois étiquettes c-Myc. Nous avons validé la capacité d'exprimer ces clones sous forme de protéine recombinante dans une souche d'expression bactérienne *E. coli* (BL21 DE3) pour une production périplasmique.

A. Identification des épitopes de Tau reconnus par les VHHs

i. Identification des épitopes de chaque VHH dirigé contre Tau 2N4R non modifiée par expérience de RMN 2D HSQC

Une analyse de séquence révèle une famille de VHH

La capacité des VHHs à reconnaître leur antigène est déterminée par leur CDRs. Nous avons donc procédé à une première analyse de ces VHHs en réalisant un alignement de séquence des 19 clones obtenus par le crible (Figure 33). Suite à cet alignement, nous avons noté que les VHHs possèdent tous des CDR1 et CDR2 différents mais de mêmes tailles, à l'exception du VHH E4 qui lui possède un résidu de moins dans son CDR2. De manière intéressante, les VHHs B10-2, C9-2, D4-2, E12-1, F8-2 et H4-2 possèdent strictement le même CDR3. Ceci suggère que l'épitope de Tau reconnu par ces VHHs leur soit commun (Figure 33) (De Genst et al., 2005).

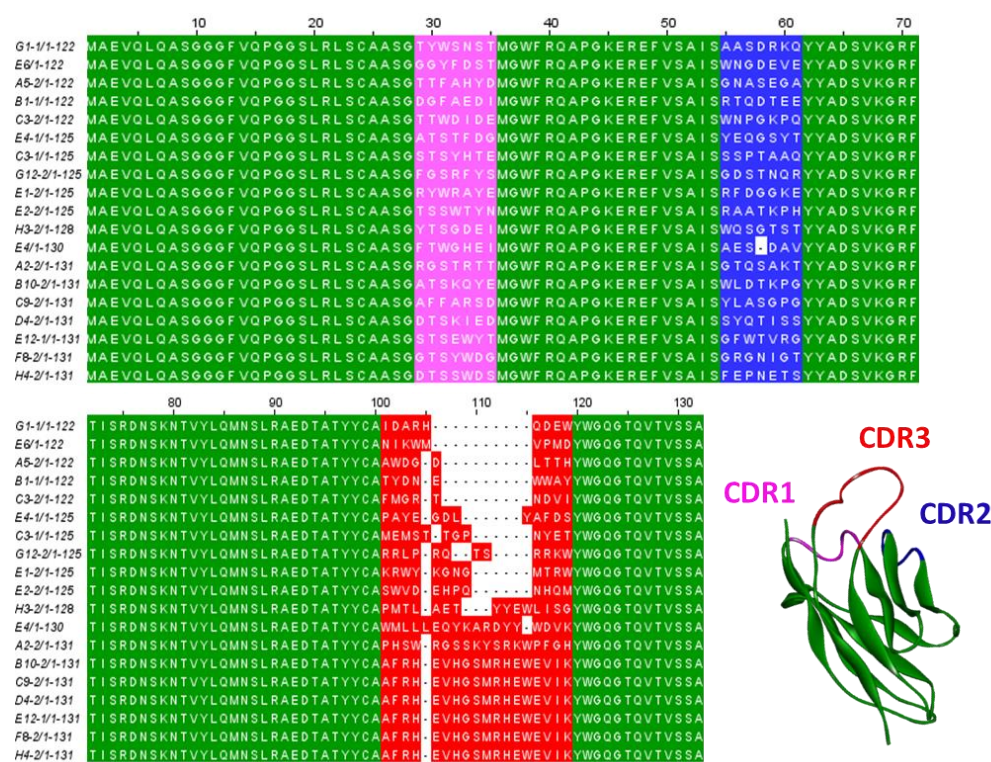


Figure 33 : Alignement des séquences des 19 VHHs dirigés contre la protéine Tau 2N4R non modifiée. Les FRs sont représentés en verts, les CDR1 en rose, les CDR2 en bleu et les CDR3 en rouge. Les VHHs B10-2, C9-2, D4-2, E12-1, F8-2 et H4-2 possèdent strictement le même CDR3.

Les expériences de RMN 2D HSQC révèlent différents épitopes

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la RMN est une technique de choix pour l'étude des interactions protéiques et plus particulièrement l'expérience de ^1H , ^{15}N HSQC, qui est souvent utilisée pour identifier les sites d'interaction entre deux partenaires. Un spectre ^1H , ^{15}N HSQC d'une protéine permet d'obtenir une cartographie de celle-ci dans laquelle chaque fonction amide de la chaîne peptidique de l'ensemble de ses résidus est identifiée par une résonance (avec une valeur de déplacement chimique et une intensité). L'interaction de cette protéine avec une autre non marquée modifie l'environnement des acides aminés impliqués dans l'interaction se traduisant par une perturbation des valeurs de déplacements chimiques et/ou une perte d'intensité des résonances correspondantes. Ainsi, il est possible de déterminer le site d'interaction d'une protéine avec une autre.

Afin de déterminer les différents sites d'interactions de chaque VHH dirigé contre Tau, la protéine Tau 2N4R recombinante marquée à l'azote ^{15}N a été mélangée avec chaque VHH non marqué et à un rapport équimolaire (ratio 1 : 1) dans un tube pour analyse RMN. L'analyse des déplacements chimiques a permis de déterminer le site d'interaction pour chaque VHH de manière relativement précise. Par exemple, si on analyse l'interaction Tau/VHH A5-2, on observe une disparition des résonances qui correspondent principalement à des résidus localisés au niveau de la région répétée R4 de Tau (Figure 34a,b). Il est également possible de localiser plus précisément l'interaction en réalisant un graphe correspondant au rapport des intensités des résonances du spectre de Tau en interaction avec le VHH (I) sur les intensités du spectre de Tau contrôle (I0). Ainsi, on peut observer la région totale qui est affectée par l'interaction avec A5-2 et qui correspond à plus de trente résidus de la région répétée R4 (Figure 34c). A partir de ces données, on peut en conclure que le VHH A5-2 reconnaît et interagit principalement avec la région répétée R4 de Tau.

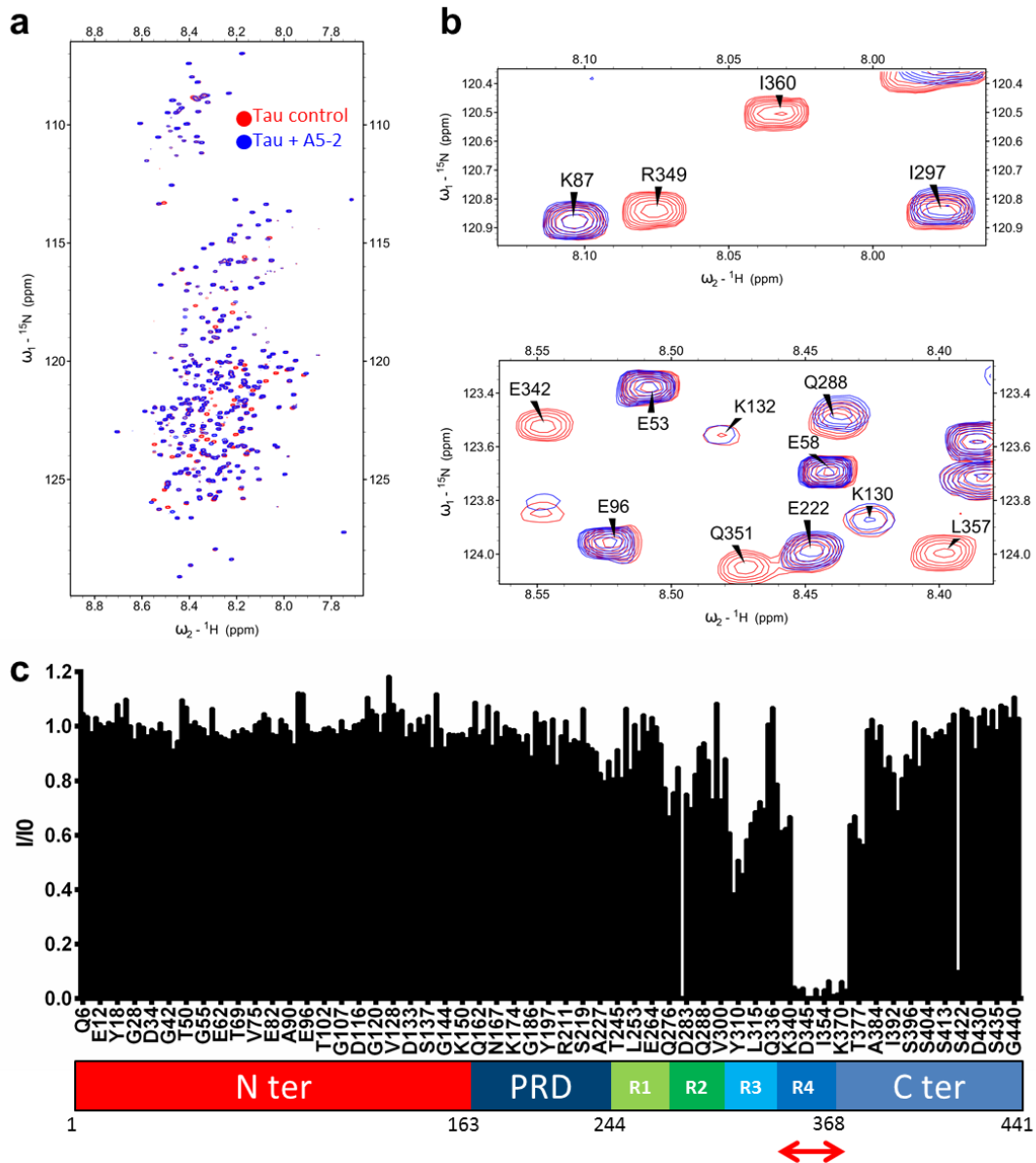
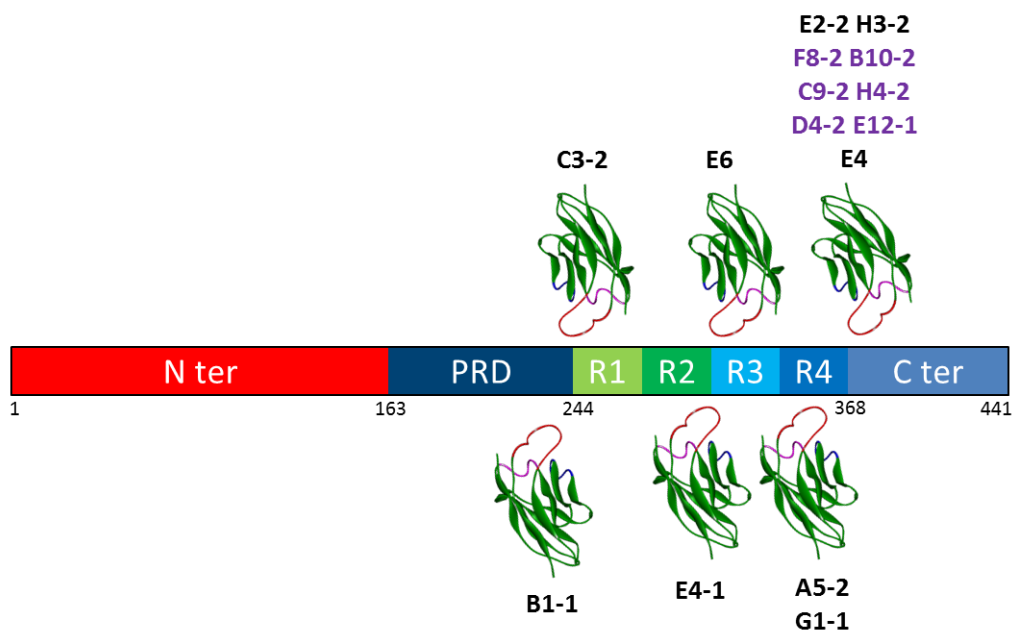


Figure 34 : a : Superposition des spectres RMN de 2D HSQC ^1H , ^{15}N de la protéine ^{15}N Tau 2N4R (en rouge) et de la protéine ^{15}N Tau 2N4R en interaction avec le VHH A5-2 (bleu). b : Agrandissement des régions des spectres superposés montrant la disparition des résonances associées aux acides aminés de Tau impliqués dans l'interaction avec A5-2. c : Ratio des intensités (I/I_0) correspondant aux résonances associées à chaque résidu de Tau du spectre Tau + A5-2 (I) avec le spectre Tau contrôle (I_0). La double flèche rouge indique la région de Tau en interaction avec A5-2.

Nous avons ainsi pu déterminer par RMN l'épitope de 15 VHHs sur les 19 obtenus par le crible (Figure 35). On observe notamment la présence d'épitope commun à certains VHHs possédant des CDR3 différents. C'est le cas pour G1-1 et A5-2 qui reconnaissent tous deux la région répétée R4, et pour H3-2, E2-2 et E4 qui reconnaissent le domaine C-ter de Tau (Figure 35). Les résultats obtenus par analyse des séquences sont également confirmés par les données RMN, puisque les 6 VHHs

ayant le même CDR3 reconnaissent strictement le même épitope localisé dans le domaine C-ter de Tau (Figure 35).



VHH	Épitope maximal
B1-1	²²² EPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRL ₂₄₃
C3-2	²⁴³ LQTAPVPMPDLKNVSKI ₂₆₀
E4-1	²⁷⁵ VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLK ₃₁₇
E6	³⁰⁶ VQIVYKPVDSLKV ₃₁₈
A5-2, G1-1	³³⁹ VKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKK ₃₇₀
E2-2, H3-2, E4, F8-2, B10-2, E12-1, C9-2, H4-2, D4-2	³⁶⁹ KIETHKLTFRNAKAKT ₃₈₆
E1-2, A2-2, G12-2, C3-1	ND

Figure 35 : Vue d'ensemble des différents épitopes de Tau reconnus par les VHHs. Le tableau révèle la région maximale contenant les épitopes de chaque VHH obtenus par RMN. Les VHHs partageants le même CDR3 sont annotés en violet.

Affinage des épitopes en utilisant des fragments de Tau

En revanche, pour les VHHs B1-1 et E4-1, il fut plus difficile de déterminer l'épitope avec précision. Les profils d'intensités des résonances indiquent que plusieurs régions semblent affectées par l'interaction avec les VHHs. Le VHH B1-1 semble interagir au niveau du PRD mais on observe également une disparition de résonances qui correspondent aux premiers résidus du domaine répété R3 (Figure 36a). En ce qui concerne le VHH E4-1, une baisse d'intensité des résonances est

observée pour les deux régions constituant le cœur des PHFs, localisées au niveau des régions répétées R2 et R3 (Figure 36b).

Pour lever l'ambiguïté, nous avons réalisé les mêmes expériences mais en utilisant des fragments de la protéine Tau comme partenaire d'interaction. Le fait que Tau soit une protéine intrinsèquement désordonnée lui confère certains avantages pour les analyses en RMN. En effet, il est possible de produire de façon recombinante uniquement certains des domaines de Tau et ainsi faciliter l'analyse des spectres. Nous avons donc réalisé des expériences de 2D HSQC avec les fragments ^{15}N F208-324 (appelé F3), F245-368 (correspond au MTBD) en interaction avec les VHHs B1-1 et E4-1 respectivement. L'analyse des profils d'intensité des résonnances montre cette fois-ci la disparition d'une seule région spécifique correspondant au site d'interaction pour B1-1, localisée au niveau du PRD de Tau (Figure 36c). En revanche, pour le E4-1, on observe toujours la disparition des deux régions au niveau des sous domaines R2 et R3 incluant les PHF6* et PHF6 (Figure 36d).

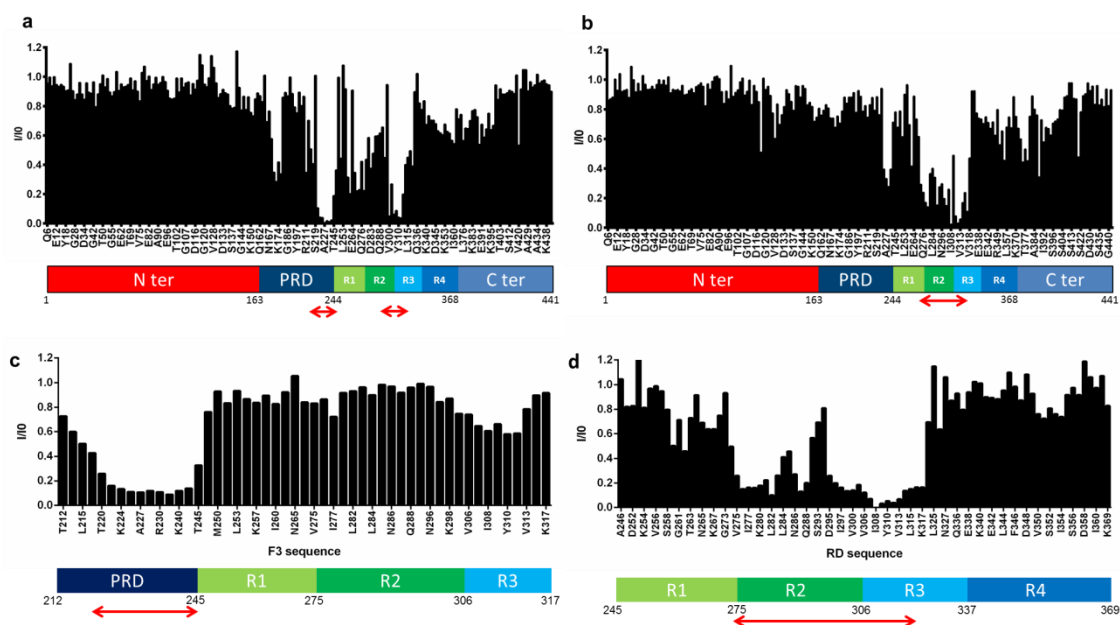


Figure 36 : Ratio des intensités (I/I_0) correspondant aux résonnances associées à chaque résidu de Tau du spectre Tau + B1-1 (I) avec le spectre Tau contrôle (I_0) (a), du spectre Tau + E4-1 avec le spectre Tau contrôle (b), du spectre du fragment F208-324 (F3) + B1-1 avec le spectre du fragment F208-324 (F3) contrôle (c) et du spectre du fragment F245-368 (RD) + E4-1 avec le spectre du fragment F245-368 (RD) contrôle (d). La double flèche rouge montre la région de Tau en interaction avec chaque VHH.

La RMN s'est révélée efficace pour déterminer le site d'interaction de Tau avec les VHHs. Nous avons ainsi déterminé les épitopes de 15 VHHs, qui reconnaissent des

régions localisées au niveau du PRD, du MTBD et du domaine C-ter de Tau (Figure 35). Nous n'avons pas obtenu de VHH dirigé contre le domaine N-ter de Tau, qui correspond à la partie acide de la protéine. L'interaction de Tau avec les VHHs semble parfois affecter l'environnement chimique de certains résidus localisés au niveau des sous domaine R2 et R3 et qui ne font pas partie du domaine d'interaction. C'est notamment le cas pour le VHH B1-1, mais cela a également été observé pour les VHHs C3-2, G1-1, H3-2, E4, D4-2, B10-2, H4-2 et E12-1. Dans ces sous domaines sont retrouvés les PHF6* et PHF6. Ces motifs ont notamment été décrits comme pouvant former des structures secondaires de type brin β en solution (Mukrasch et al., 2009). Il est possible que l'interaction de Tau entière avec le VHH puisse favoriser ces repliements locaux qui se traduisent par une disparition des résonances correspondantes sur les spectres.

ii. Identification de l'épitope du VHH E5-1 dirigé contre Tau phosphorylée *in vitro* par de l'extrait de cerveau de rat

Comme nous avons pu le voir dans l'introduction, la phosphorylation de Tau joue un rôle essentiel dans la régulation de la polymérisation des microtubules. Dans les tauopathies, la phosphorylation anormale de Tau pourrait jouer un rôle important dans son agrégation (Alonso et al., 2001; Despres et al., 2017). Elle est également largement étudiée par le biais d'anticorps spécifiques de certains épitopes phosphorylés pour détecter les NFTs dans les études précliniques et pour réaliser les diagnostics *post-mortem* (Braak et al., 2006; Saito et al., 2004). Nous avons donc décidé de générer également des VHHs spécifiques de sites phosphorylés de Tau.

Nous avons obtenu 11 VHHs dirigés spécifiquement contre la protéine Tau phosphorylée. L'analyse par alignement multiple de séquences montre que les VHHs diffèrent tous au niveau de leurs CDRs.

Nous avons produit la protéine Tau 2N4R marquée ^{15}N que nous avons par la suite phosphorylée *in vitro* (Tau-P). La caractérisation des résidus phosphorylés par l'extrait de cerveau de rat a été réalisée au laboratoire auparavant (Qi et al., 2016). Environ une vingtaine de résidus sont retrouvés phosphorylés par l'extrait de cerveau de rat. Les résonances correspondantes sont déplacées à gauche (à bas champs) sur le spectre (Figure 37a). On retrouve notamment de nombreux épitopes

phosphorylés dans la MA et reconnus par des anticorps utilisés régulièrement dans des études d'immunomarquages tels que AT8 (pS202, pT205 et pS208), AT180 (pT231, pS235) et PHF1 (pS396, pS404) (Figure 37b) (Hanger et al., 2009; Qi et al., 2016).

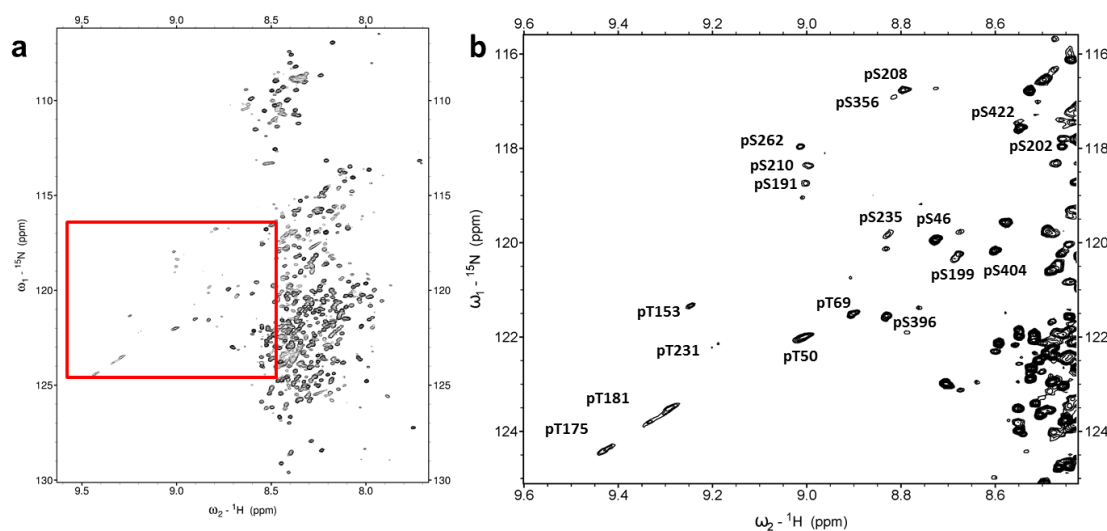


Figure 37 : a : Spectre de 2D HSQC ^1H , ^{15}N de la protéine ^{15}N Tau 2N4R phosphorylée par de l'extrait de cerveau de rat. Le carré rouge correspond à la position des résidus phosphorylés sur le spectre. La phosphorylation des résidus induit en effet un déplacement des résonances, comparé aux résidus non phosphorylés, sur la gauche du spectre. b : Agrandissement du spectre présentant les résonances associées aux résidus phosphorylés qui sont annotées avec le résidu phosphorylé correspondant dans la séquence.

Nous avons mélangé de la protéine Tau-P recombinante marquée ^{15}N dans un tube de RMN avec un premier VHH appelé E5-1 non marqué et à un rapport équimolaire pour chaque. Après superposition des spectres RMN, on peut observer une différence de déplacement chimique des résidus phosphorylés entre le spectre de Tau contrôle et le spectre de Tau en interaction avec E5-1. Les groupements phosphates sont sensibles à d'infimes variations de pH car les pKa des résidus sérine et thréonine phosphorylés sont proches du pH de l'expérience et c'est pourquoi les résidus phosphorylés ne sont pas toujours complètement superposés sur le spectre (Figure 38a). Cela ne nous empêche pas d'observer la disparition spécifique de deux résidus phosphorylés qui sont la phospho-sérine 46 (pS46) et la phospho-thréonine 50 (pT50) (Figure 38a). Ces données sont également confirmées par analyse des profils d'intensité des résonances qui valident l'identification de pS46–pT50 comme l'épitope reconnu par E5-1 (Figure 38b). Ces deux sites de phosphorylation ont été

identifiés dans des cerveaux de patients Alzheimer (Noble et al., 2013), mais aucun anticorps dirigé contre cet épitope n'a encore été décrit.

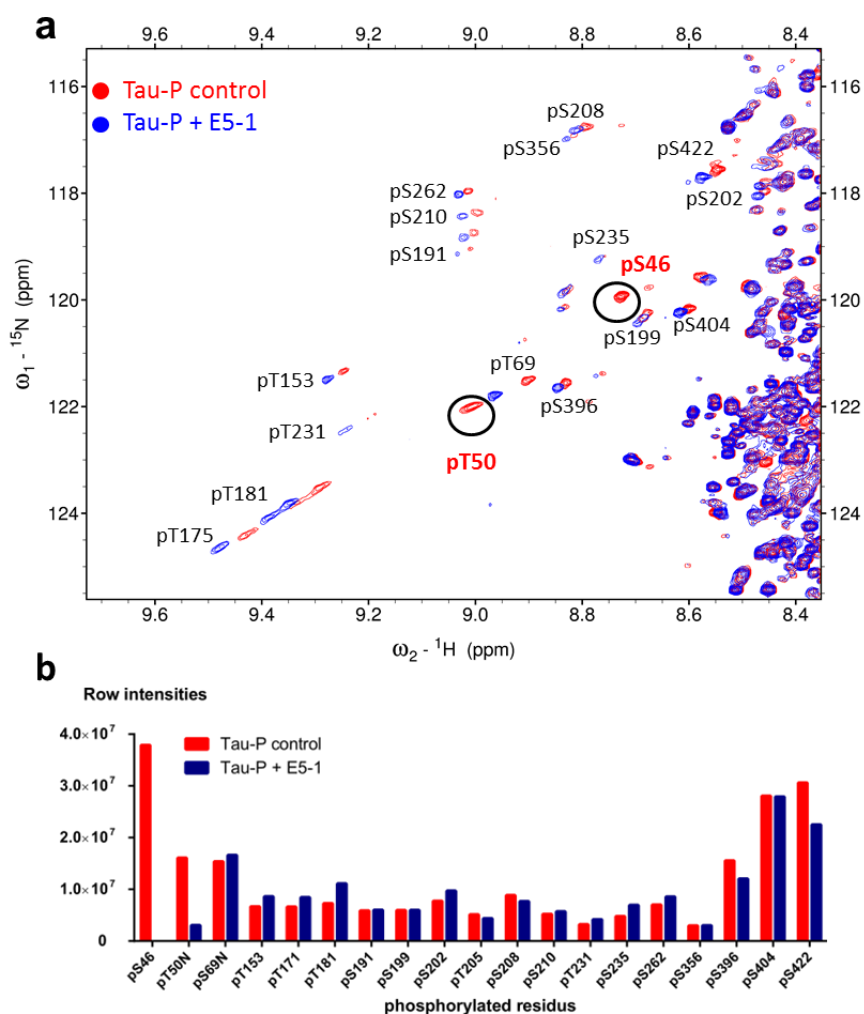


Figure 38 : a : Superposition des spectres RMN de 2D HSQC ^1H , ^{15}N de la protéine ^{15}N Tau 2N4R phosphorylée (en rouge) et de la protéine ^{15}N Tau 2N4R phosphorylée en interaction avec le VHH E5-1 (bleu). Les cercles noirs sur le spectre représentent la disparition des résidus impliqués dans l'interaction. b : Profil des intensités pour chaque résonance correspondant aux résidus phosphorylés de Tau pour les deux spectres.

Ces résultats démontrent qu'il est également possible de déterminer les épitopes des VHHs anti Tau-P par RMN 2D HSQC. Le développement et la caractérisation des VHHs dirigés contre des épitopes phosphorylés de Tau représentent un potentiel important en termes de diagnostique. Moins coûteux à produire, les VHHs pourraient être une bonne alternative aux anticorps pour les analyses réalisées par immunohistochimie (Li et al., 2016b), mais pourrait également permettre de

déterminer de nouveaux épitopes phosphorylés plus spécifiques à chaque tauopathie.

De nombreux travaux restent à réaliser pour caractériser ces VHHs anti-Tau-P. Toutefois, au cours de ma thèse, nous nous sommes principalement concentrés sur l'étude des VHHs dirigés contre la protéine Tau 2N4R non modifiée. Les résultats qui vont suivre portent maintenant exclusivement sur la caractérisation de ces VHHs.

B. Détermination des affinités VHHs/Tau

Une fois les épitopes identifiés par RMN, nous avons par la suite déterminé les affinités des interactions entre Tau 2N4R et chaque VHH. Cette affinité se traduit par la valeur de la constante d'équilibre également appelé KD. Le KD correspond à la force de l'interaction entre deux partenaires moléculaires. Plus l'interaction est forte, plus le KD est faible. Le KD est un paramètre très souvent déterminé car il permet de comprendre la régulation des systèmes biologiques et d'estimer le potentiel thérapeutique de molécules dans les études cliniques.

Au sein du laboratoire, nous avons à notre disposition un large panel de techniques nous permettant d'évaluer l'affinité de l'interaction entre Tau et les VHHs, telles que la spectroscopie de fluorescence, la calorimétrie de titration isotherme et la résonance plasmonique de surface.

Dans un premier temps, nous avons décidé d'utiliser la spectroscopie de fluorescence en utilisant les propriétés intrinsèques de la protéine Tau. La protéine Tau ne contient pas de résidu tryptophane. Cela constitue une caractéristique avantageuse pour réaliser une titration du VHH qui lui, possède des résidus tryptophanes au sein de la boucle CDR3 et /ou dans l'environnement proche de la boucle (Figure 33). Nous avons été capables par cette méthode de détecter les interactions Tau-VHH. Cependant, le système utilisé ne permettait pas d'estimer de façon précise les KDs de chaque interaction. Nous avons également essayé d'autres méthodes comme la calorimétrie de titration isotherme et la polarisation de fluorescence qui se sont malheureusement soldées par un échec.

Enfin, nous avons réalisé des essais en utilisant la résonance plasmonique de surface (ou SPR pour « Surface Plasmon Resonance »). La SPR est une méthode

biophysique permettant de déterminer les affinités régissant l'interaction entre deux partenaires moléculaires et qui se base sur le principe de transfert de masse. Brièvement, un des partenaires est immobilisé sur une puce. Sur cette même puce, un flux passe en continu et contient le second partenaire libre en solution. Les changements de masse sur la puce résultant de l'interaction entre les deux partenaires sont mesurés et permettent d'enregistrer un sensorgramme. En augmentant de façon croissante la quantité de partenaire libre dans le flux, il est possible de déterminer les constantes d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) du complexe et ainsi d'en déduire le KD résultant de l'interaction (Figure 39).

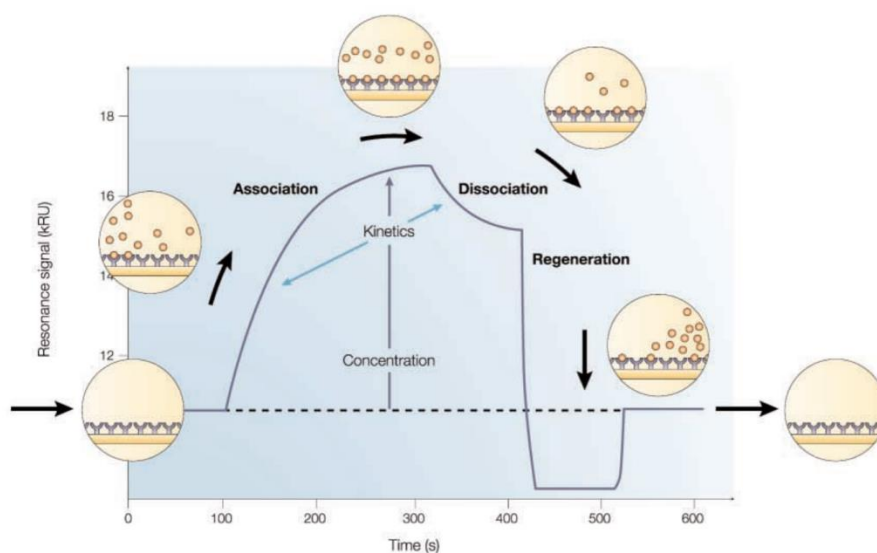


Figure 39 : Sensorgramme typique obtenu suite à une mesure d'interaction entre deux partenaires par SPR. $t = 100s$: Contact entre la solution de l'analyte dans le flux avec le ligand immobilisé sur la puce. L'augmentation du signal correspond à l'association du complexe. $t = 320s$: La solution contenant l'analyte est remplacée par du tampon dans le flux. On peut ainsi observer la dissociation du complexe. Si la concentration de l'analyte injectée est connue, il est alors possible d'en déduire les constantes d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) du complexe et ainsi de déterminer la constante d'équilibre KD par l'équation : $KD = k_{off} / k_{on}$ (Cooper, 2002).

Dans notre cas, nous avons utilisé une puce fonctionnalisée avec de la streptavidine. L'idée a été dans un premier temps d'immobiliser la protéine Tau 2N4R préalablement biotinylée sur la puce. Cette première étape s'est révélée être critique, car une trop forte biotinylation de Tau (huit molécules de biotine pour une molécule de Tau) ne nous a pas permis de mesurer les interactions. Après différents essais, nous avons préparé une puce contenant Tau2N4R biotinylée (environ trois molécules de biotines par molécule de Tau) fonctionnelle. Nous avons utilisé la

méthode de « Single Cycle Kinetics » (SCK) qui permet de mesurer sur le même sensorgramme les k_{on} et k_{off} pour chaque concentration de VHHs injectée (Figure 40). Cette méthode a l'avantage de ne pas avoir à attendre la dissociation complète qui résulte de la précédente mesure. Nous avons remarqué que la présence de l'étiquette c-Myc pouvait faiblement moduler l'affinité entre les VHHs et la protéine Tau. Les paramètres d'affinité pour le VHH A5-2 n'ont pas pu être déterminés avec la construction c-Myc (Table 1). Toutefois, la majorité des KD ont pu être déterminés avec ces constructions. De plus, nous avons également observé que les étiquettes c-Myc améliorent la solubilité des VHHs, et ont par ailleurs été utilisées comme épitopes pour réaliser des immunomarquages par la suite. Dans un souci d'uniformité des expériences, la caractérisation biochimique des VHHs a donc été réalisée avec des constructions c-Myc.

Grâce à cette puce, nous avons pu cribler la majorité des VHHs et ainsi déterminer les k_{on} , k_{off} et KD des différents complexes Tau-VHH (Table 1). Pour les différents VHHs mesurés, les KD sont compris entre 30 nM et 4,5 μ M (Figure 40). Certains de ces VHHs, tels que H3-2, E2-2 et C3-1 possèdent une affinité très forte pour Tau, tandis que d'autres comme H4-2, D4-2 et E6 ont une affinité beaucoup moins élevée et dont le KD se situe au-dessus du μ M (Table 2).

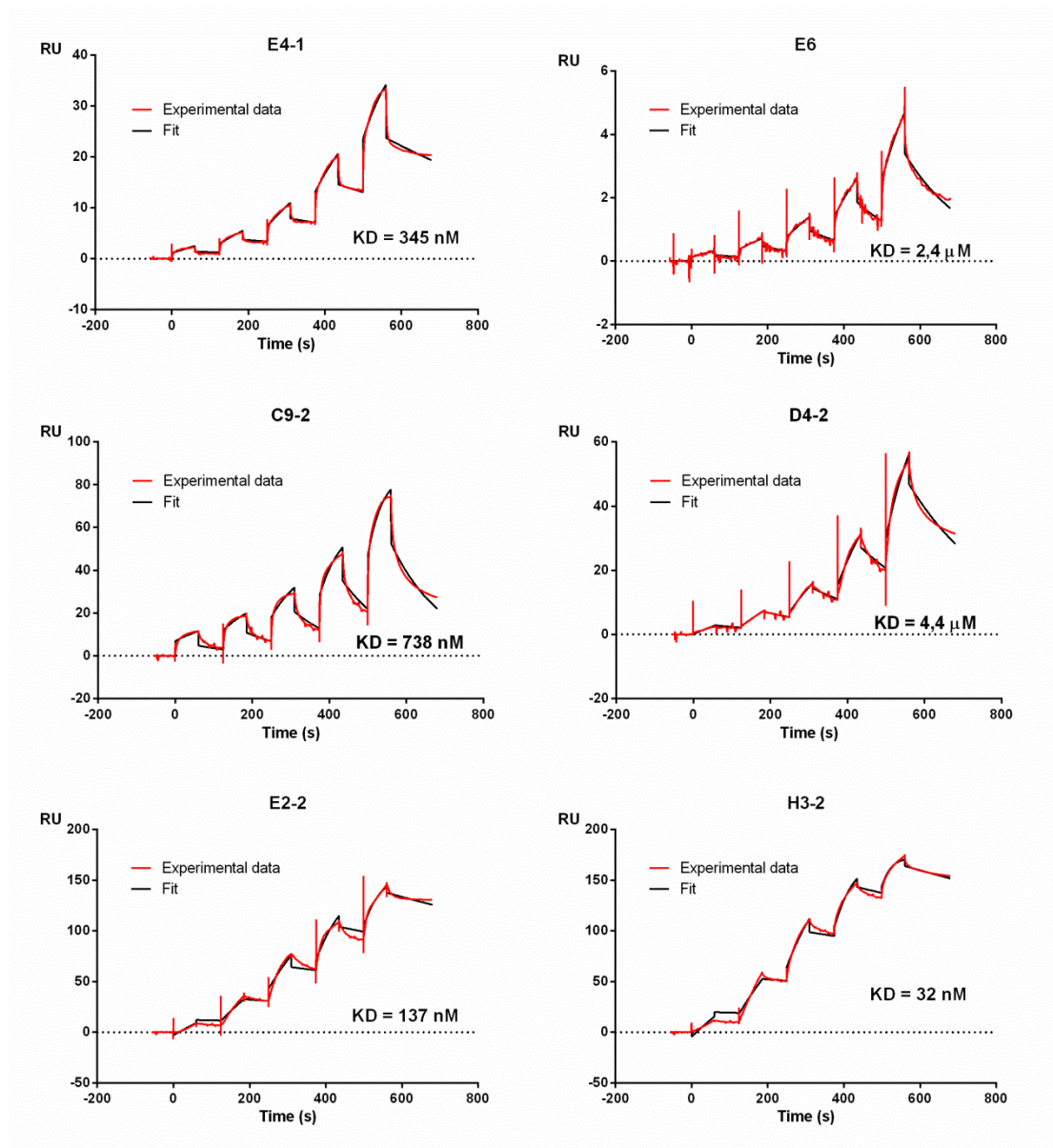


Figure 40 : Détermination des KD par résonance plasmonique de surface. Représentation des sensorgrammes obtenus pour les VHHs E4-1, E6, C9-2, D4-2, E2-2 et H3-2. Les KD ont été obtenus en utilisant la méthode Single Cycle Kinetics (SCK) où le retour à l'équilibre (étape de régénération) après chaque dissociation n'est plus nécessaire.

Globalement, les valeurs de KD obtenues sont plus faibles que les affinités généralement mesurées pour les VHHs dirigés contre des protéines structurées, qui se situent plus souvent dans des valeurs inférieures à la centaine de nM et proches du nM (Dumoulin et al., 2002). Toutefois, les VHHs sont généralement plus utilisés pour reconnaître des épitopes de type conformationnel et le mécanisme d'interaction n'est pas le même que pour un VHH dirigé contre une protéine désordonnée. Les épitopes de Tau reconnus par nos VHHs sont probablement de

type linéaire, ce qui peut expliquer les valeurs de KD plus faibles obtenues. De plus, les valeurs de KD pour 8 de nos 19 VHHs sont proches de celles obtenues pour le VHH NbSyn2 qui reconnaît la partie C-terminale de la protéine intrinsèquement désordonnée α -synucléine et dont le Kd est compris entre 100 et 260 nM (De Genst et al., 2010).

VHH	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	KD (nM)	SE (nM)
A5-2	23198	0.0065	278	6.7
G1-1	694	0.0028	4089	155.7
B1-1	6586	0.0048	735	26.9
C3-2	13853	0.0038	275	2.3
E4-1	4983	0.0017	345	9.2
E6	2472	0.0059	2407	82.9
H3-2	20664	0.0007	32	1.2
E4	4866	0.0036	731	27.7
E2-2	5500	0.0008	137	4.2
B10-2	19425	0.0358	1845	42.5
C9-2	9839	0.0073	738	12.9
D4-2	956	0.0042	4421	84.1
E12-1	6635	0.0054	819	18.2
H4-2	1455	0.0066	4502	848.8
F8-2	3170	0.0042	1332	31.3
G12-2	5100	0.0030	583	10.2
C3-1	17582	0.0018	100	2.5
E1-2	27462	0.0086	313	6.5
A2-2	23380	0.0030	130	5.6

Table 1 : Constantes d'association (k_{on}), de dissociation (k_{off}) et constantes d'équilibre (KD) obtenues par SPR pour les différents complexes VHHs/Tau. Les VHHs annotés en violets sont les VHHs qui partagent le même CDR3. Les VHHs annotés en rouge sont les VHHs pour les épitopes n'ont pas été déterminés.

On observe également des différences de KD entre les VHHs partageant le même CDR3. Par exemple, C9-2 a une affinité 7 fois plus grande pour Tau que H4-2 (Table 1). Les CDR1 et CDR2 qui sont eux uniques à chaque VHH (Figure 33) pourraient jouer un rôle dans leur affinité avec leurs partenaires et pourrait expliquer les différences observées.

C. Optimisation des VHHs

La caractérisation des affinités par SPR a révélé des KDs supérieurs au μ M pour certains VHHs, traduisant plutôt une faible affinité pour une interaction antigène-VHH. Toutefois, il existe des méthodes biomoléculaires permettant d'optimiser leur affinité pour leur antigène.

Hybrigenics service a par ailleurs développé une méthode de mutagenèse aléatoire combinée à un criblage en double hybride permettant la sélection de mutants de

VHHs plus affins et qui conservent la reconnaissance du même épitope. Toutefois, cette méthode se base sur l'expression intracellulaire des VHHs dans un modèle de levure et requiert donc l'utilisation de VHH stable et fonctionnel après expression intracellulaire. Certains des VHHs obtenus suite au crible de phage display présentent une activité intracellulaire naturelle. C'est le cas pour le VHH F8-2 qui, une fois exprimé de manière intracellulaire dans un modèle cellulaire N2A, est capable de se fixer à la protéine Tau (Figure 41).

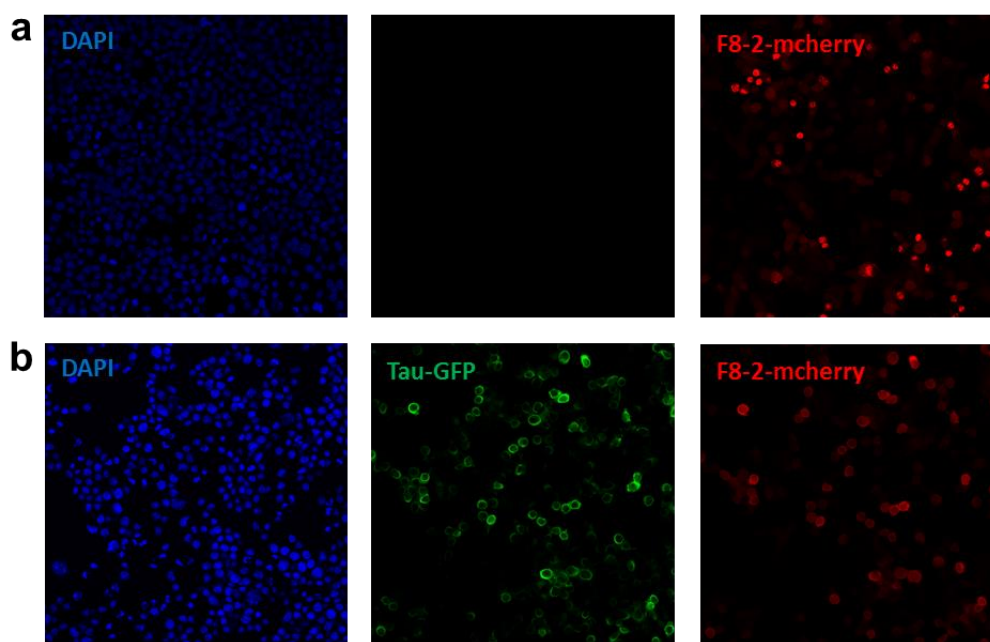


Figure 41 : F8-2 est exprimé et interagit avec Tau dans le modèle cellulaire N2A. Des cellules N2A ont été transfectées par un plasmide pMcherry permettant l'expression intracellulaire du VHH F8-2 fusionné à la m-Cherry ou co-transfectées avec le plasmide pEM15 permettant l'expression de la protéine Tau fusionnée à la GFP et son adressage à la membrane plasmique des cellules. Les images ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal (grossissement 20X). a : Pour les cellules qui ont été uniquement transfectées avec le plasmide pMcherry, le VHH F8-2 est localisé principalement dans le noyau et un peu dans le cytoplasme. b : En revanche, pour les cellules qui ont été co-transfectées avec les deux plasmides, le VHH F8-2 est localisé au niveau de la membrane plasmique des cellules tout comme la protéine Tau. Ces résultats suggèrent fortement que F8-2 est fonctionnel et interagit avec Tau dans la cellule.

F8-2 pourrait être un outil efficace pour réaliser des études se basant sur l'expression intracellulaire. Toutefois, avec un KD estimé à $1,3 \mu\text{M}$ (Figure 40), le VHH F8-2 ne possède pas une haute affinité pour Tau ce qui peut rendre les études plus difficiles. Nous avons donc réalisé en collaboration avec Hybrigenics service, la sélection et caractérisation de nouveaux mutants F8-2, reconnaissant le même épitope et possédant une meilleure affinité. Pour cela, une banque de mutants a été réalisée par mutagenèse aléatoire à partir de la totalité de la séquence codant pour

F8-2. Cette banque a par la suite été criblée par double hybride levure et a permis de sélectionner quatre clones positifs : les mutants S54L, R111C, C24F G60D et F8-2 S54L T128A (Figure 42).

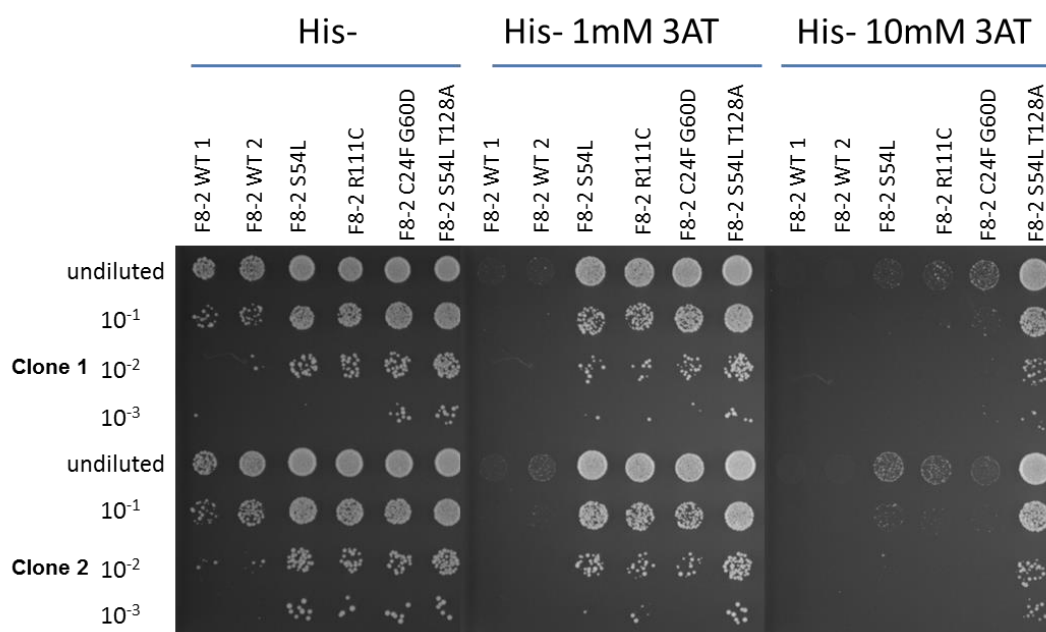
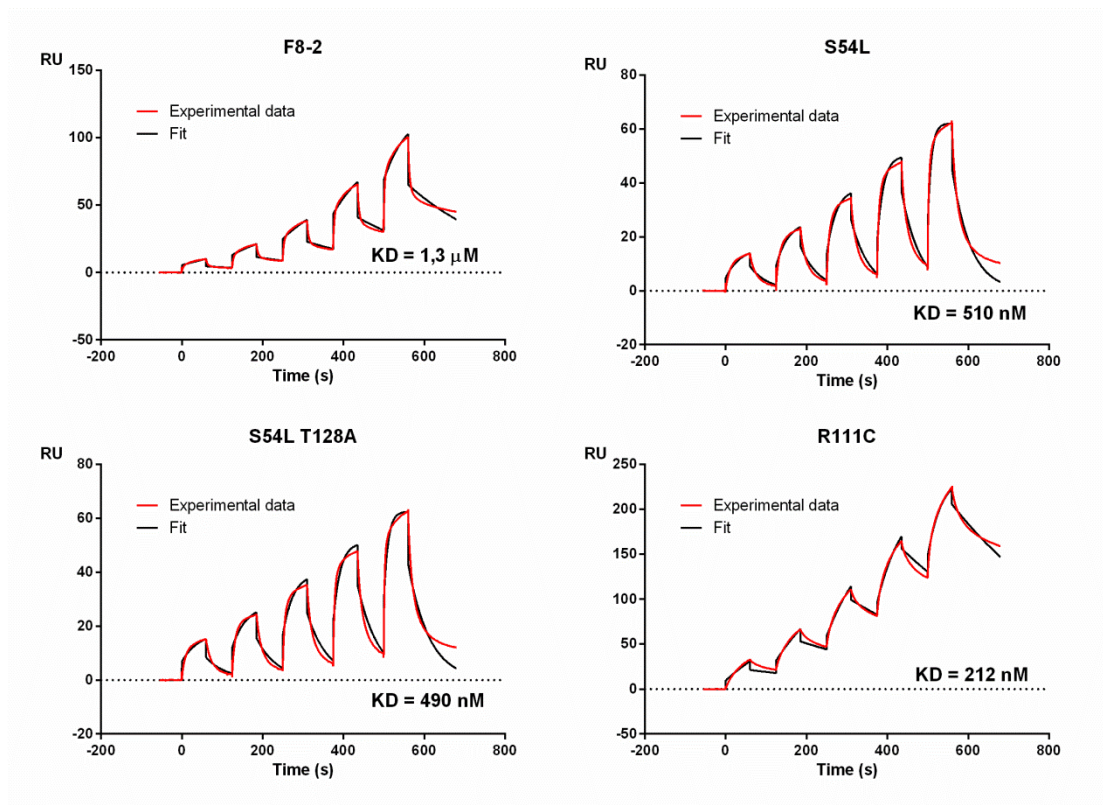


Figure 42 : Sélections des mutants optimisés par double hybride réalisé par Hybrigenics service. Le contrôle négatif utilisé dans l'expérience est F8-2. Les interactions entre Tau et les mutants par double hybride sont évaluées par dilution des levures sur milieu sélectif dépourvu d'histidine et contenant des concentrations croissantes de 3-aminotriazole (3AT). Le crible double hybride a permis de sélectionner quatre clones positifs.

Les mutations sont localisées dans les domaines FR du VHH excepté pour le mutant R111C, où la substitution de l'arginine par la cystéine est localisée dans le CDR3. Nous avons également confirmé par RMN l'épitope reconnu qui reste strictement identique au VHH F8-2 et qui reconnaît l'épitope $_{369}\text{KIETHKLTFR} \text{NAKAKT}_{386}$ localisé dans le domaine C-ter de Tau.

Par la suite, nous avons validé l'optimisation en déterminant les KDs par SPR pour trois des quatre mutants obtenus par double hybride. Nous avons de la même manière que précédemment utilisé la méthode de SCK qui permet de mesurer sur le même sensorgramme les k_{on} et k_{off} pour chaque concentration de VHHs injectés (Figure 43).



VHH	k_{on} (1/M.s)	k_{off} (1/s)	KD (nM)
F8-2	3,17E+03	0,0042	1332
F8-2 R111C	1,33E+04	0,0028	212
F8-2 S54L	4,35E+04	0,0220	510
F8-2 S54L T124A	3,94E+04	0,0193	490

Figure 43 : Détermination des KDs par SPR. Représentation des sensorgrammes obtenus pour les VHHs F8-2 ainsi que pour les trois mutants. Les KDs ont été obtenus en utilisant la méthode SCK. Tableau représentant les constantes d'association (k_{on}), de dissociation (k_{off}) et constantes d'équilibre (KD) obtenues par SPR pour les différents complexes F8-2-mutants/Tau.

Nous avons ainsi validé par SPR l'optimisation réalisée à partir de F8-2. Les trois mutants présentent une meilleure affinité que le VHH F8-2 avec notamment un KD six fois plus faible pour le mutant R111C (Figure 43). Toutefois, il est difficile d'associer l'optimisation du KD mesuré par SPR avec le phénotype observé lors du double hybride. On aurait pu en effet s'attendre à une meilleure affinité avec le double mutant S54L T128A. Les constructions VHHs utilisées dans ces deux expériences possèdent probablement des propriétés intrinsèques d'expression et de solubilité distinctes, ce qui peut expliquer ces différences.

Les résultats obtenus sur l'optimisation du VHH F8-2 ainsi que ses mutants vont faire l'objet d'un article qui est actuellement en cours de rédaction. Le mutant R111C sera utilisé prochainement dans de nouvelles expériences cellulaires pour étudier les mécanismes de propagation de Tau.

II. Inhibition de l'agrégation de Tau par l'utilisation des VHHs

Suite à notre introduction, nous avons pu voir que la protéine Tau est observée dans les tauopathies sous une forme agrégée de type fibrillaire très ordonnée appelé PHF, composant eux même les NFTs (J.-P. Brion et al., 1985). Les mécanismes d'agrégation de Tau sont méconnus, mais il est aujourd'hui admis que les cœurs des PHFs sont principalement composés des régions répétées du MTBD, et que l'organisation structurale des PHFs dépend du type d'isoforme et de la tauopathie dont elles sont issus (Falcon et al., 2018; Fitzpatrick et al., 2017). De plus, de nombreux chercheurs suggèrent aujourd'hui que Tau pourrait également adopter un comportement de type prion. Tau pourrait se propager entre les cellules nerveuses, recruter la Tau endogène afin d'induire son agrégation, conduisant par la suite à la formation de nouvelles NFTs (Mudher et al., 2017).

Au vue de ces hypothèses, notre but a été de déterminer les effets que pourraient avoir ces différents VHHs au regard de leurs épitopes et de leurs affinités sur certains mécanismes pathologiques de Tau. Est-il possible de cibler l'agrégation avec un VHH dirigé contre le MTBD ? Peut-on bloquer le recrutement intracellulaire de Tau par des espèces fibrillaires et ainsi inhiber le phénomène de nucléation ? Peut-on bloquer la transmission de différentes formes de Tau pouvant transmettre la pathologie entre les cellules et par quels mécanismes ? Nous nous sommes dans un premier temps concentrés sur l'agrégation de Tau et l'utilisation des VHHs pour interférer avec ce processus.

A. E4-1, E6 et H3-2 inhibent l'agrégation de Tau *in vitro*

Afin d'évaluer le potentiel d'inhibition de l'agrégation de Tau par les VHHs, nous avons réalisé des expériences d'agrégation de Tau *in vitro*, en présence d'héparine et

en présence ou absence de VHH. L'héparine que nous avons précédemment décrit est un glycosaminoglycane sulfaté présent dans la matrice extracellulaire et communément utilisé pour induire l'agrégation de Tau *in vitro* (Goedert et al., 1996). Nous avons réalisé les expériences d'agrégation en présence de la ThT afin de pouvoir suivre les cinétiques d'agrégation. Afin de visualiser l'effet des VHHs sur la cinétique d'agrégation, différents ratio Tau/VHH ont été réalisés (Figure 41).

Les VHHs utilisés dans cette expérience sont A5-2, C3-2, B1-1, E4-1, F8-2, B10-2, E6 et H3-2. Les VHHs E2-2, E4, G1-1, C9-2, H4-2, E12-1, D4-2 qui partagent le même épitope que les autres VHHs, ainsi que ceux dont l'épitope n'a pas pu être précisément déterminé par RMN n'ont pas été testés. De manière générale, on observe un effet plus ou moins marqué de l'ensemble des VHHs testés sur l'agrégation de Tau en présence d'une quantité de VHH importante (ratio Tau/VHH 1 : 1) (Figure 41). Toutefois, à ce même ratio, les VHHs H3-2, E4-1 et E6 ont un effet bien plus prononcé et inhibent l'agrégation de Tau, avec une diminution du signal d'agrégation à 40% pour E4-1 et à moins de 10% pour E6 et H3-2 après 16h de réaction. L'effet le plus important est retrouvé avec le VHH E6. A un ratio de 1 : 0,5, le signal d'agrégation n'est qu'à 6% en fin de réaction et n'évolue pas, signifiant qu'il n'y a pas de formation de fibres de Tau et donc aucune agrégation (Figure 41). Nous nous sommes donc par la suite demandé par quels mécanismes H3-2, E4-1 et E6 inhibent l'agrégation de Tau ?

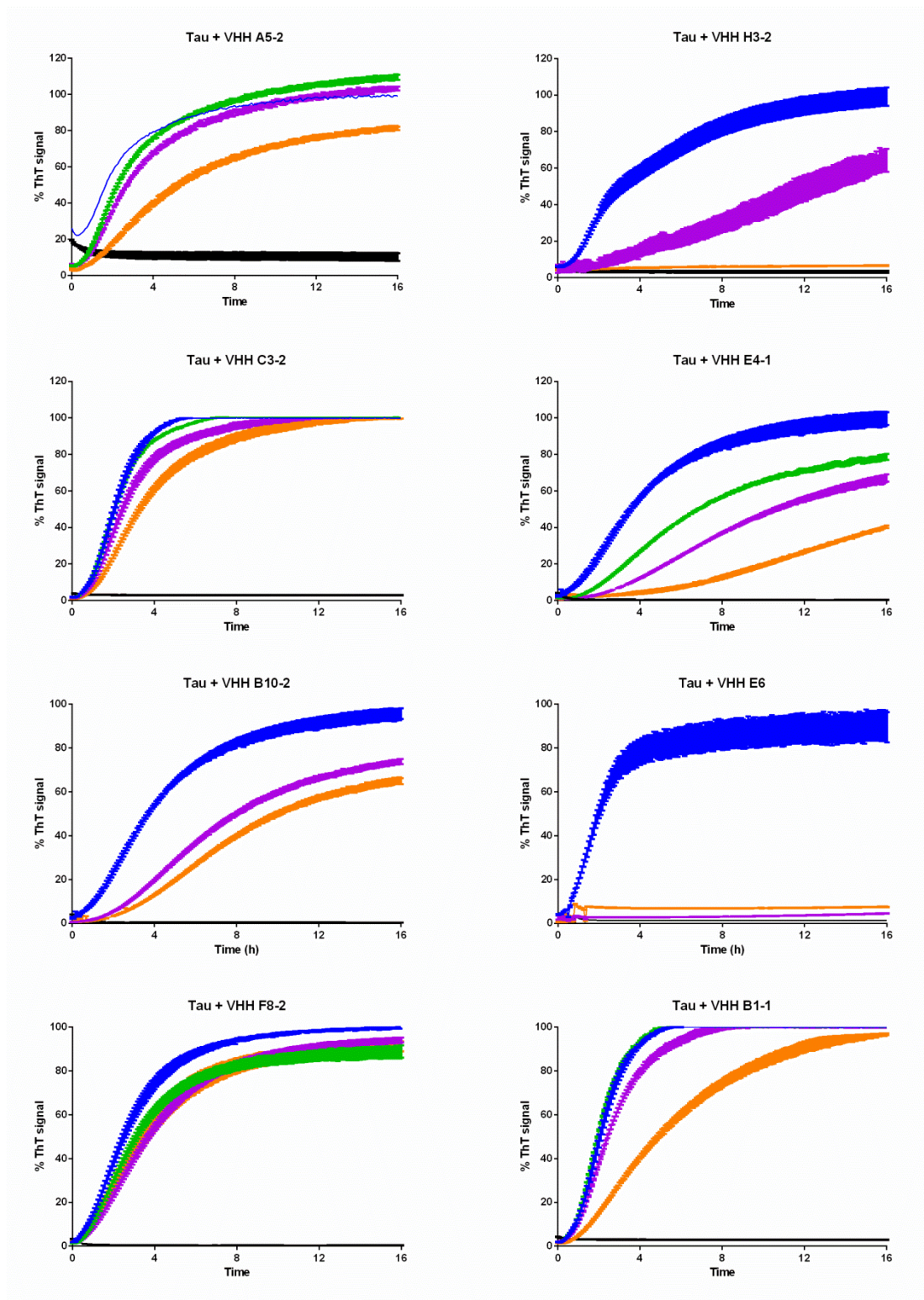


Figure 44 : Suivi par fluorescence de la ThT de la cinétique d'agrégation *in vitro* à l'héparine de la protéine Tau en absence ou en présence de 8 différents VHHs. Le nom des VHHs utilisés pour chaque expérience est annoté au-dessus de chaque graphe. Des ratios de Tau/VHH 1 : 0 (courbe bleu), 1 : 0,25 (courbe verte), 1 / 0,5 (courbe orange) et 1 : 1 (courbe mauve) ont été réalisés. La courbe noire correspond au suivi de la cinétique d'agrégation de Tau sans héparine. Afin de faciliter l'analyse, l'émission de fluorescence de la ThT est présentée en pourcentage et a été normalisée par rapport au contrôle positif (courbe bleu) qui correspond à 100 % d'agrégation.

Une possibilité qu'il faut considérer dans cette expérience *in vitro* est que l'inhibition provient d'une perturbation de l'interaction de Tau avec l'héparine. Cette interaction a été étudiée par RMN et révèle que l'héparine se fixe principalement au niveau du MTBD et du motif PHF6, mais il a également été décrit que l'héparine se fixe aussi à des résidus localisés au début du domaine C-ter de la protéine Tau (Sibille et al., 2006).

Pour les VHHs A5-2, C3-2 et B10-2, l'effet sur l'agrégation reste modéré. Ces VHHs n'affectent pas fortement l'agrégation probablement en raison de l'épitope qui se trouve en dehors du cœur des fibres. Par contre, les VHHs E4-1 et E6 ciblent les cœurs d'agrégation de la protéine Tau et pourraient empêcher les interactions intermoléculaires de Tau nécessaires à la nucléation. E6 reconnaît le motif PHF6. Pour E4-1, l'épitope est moins bien défini mais il se lie à l'intersection des sous domaines R2 et R3 et semble inclure comme site d'interaction les deux motifs PHF6* et PHF6 (Figure 35). E4-1 et E6 pourraient néanmoins aussi gêner l'agrégation de Tau par phénomène de compétition avec l'héparine, au niveau des motifs PHFs. Ces deux VHHs interviennent à la première étape du processus d'agrégation de Tau, qui est l'étape de nucléation en séquestrant la Tau monomérique (Figure 29). En termes d'affinité, le temps de résidence sur Tau est normalement plus important, pour E4-1. Cependant, nous observons une meilleure inhibition de l'agrégation avec E6. Nous n'avons donc pas une corrélation parfaite entre les affinités déterminées et les capacités d'inhibition des VHHs. En revanche, l'inhibition de l'agrégation de Tau par le VHH H3-2 reste difficile à interpréter. Les VHH H3-2 et B10-2 reconnaissent le même épitope au niveau du domaine C-ter. Pourtant la réponse est sensiblement différente. Plusieurs hypothèses sont donc à explorer pour pouvoir interpréter cette forte inhibition exercée par H3-2 :

- Le VHH H3-2 cible le domaine C-ter et entrerait en compétition au niveau des sites secondaires à l'héparine. Ceci combiné à une forte association et une faible dissociation du complexe, entraîne une inhibition importante de l'agrégation de Tau.
- Le VHH H3-2 inhibe l'agrégation de Tau en la maintenant sous une forme oligomérique non détectée par émission de fluorescence la ThT. Pour tester

cette hypothèse, il sera nécessaire de réaliser des analyses par microscopie électronique.

Cette expérience nous a permis de caractériser trois VHHs capables d'inhiber de manière importante l'agrégation de Tau. Nous avons présentés les résultats sous forme de crible pour chaque expérience de RMN, SPR et d'agrégation *in vitro*. Toutefois, les résultats n'ont pas été obtenus au cours de la même période pour chaque VHH. C'est le cas pour les VHHs E6 et H3-2, dont les résultats ont été obtenus bien après les résultats obtenus pour le VHH E4-1. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés par la suite sur l'étude du VHH E4-1. Bien évidemment, les VHH E6 et H3-2 sont d'intérêts et toujours en cours d'étude au laboratoire.

B. Inhibition de l'agrégation de Tau par l'utilisation du mutant Z70 optimisé et dérivé du VHH E4-1

Dans cette partie seront décrits les résultats obtenus avec le VHH Z70, un mutant qui a été généré à partir du VHH E4-1. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet (IT BIO18023) ainsi que d'un article en cours de soumission. Pour éviter une présentation des résultats redondants à l'article, nous avons fait le choix de vous présenter un résumé de l'article en français suivi par l'article.

i. Résumé de l'article :

La protéine neuronale Tau est observée sous une forme agrégée et hyperphosphorylée dans le cerveau des patients atteints par la maladie d'Alzheimer et par d'autres maladies neurodégénératives communément appelées tauopathies. L'évolution et la propagation de ces agrégats de Tau sont étroitement associées au déclin cognitif observé chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Les mécanismes moléculaires déclenchant l'agrégation de Tau en conditions pathologiques restent aujourd'hui peu connus, mais le domaine de liaison au microtubule comprenant les deux motifs PHF6*₂₇₅VQIINK₂₈₀ et PHF6₃₀₆VQIVYK₃₁₁ a été décrit à de nombreuses reprises comme essentiel au processus d'agrégation et

de nucléation de Tau. Dans cette optique, le but de cette étude a été de développer et sélectionner des VHHs dirigés contre Tau afin de moduler son agrégation.

Les épitopes de chaque VHH ont été identifiés par RMN, permettant la sélection du VHH E4-1, dirigé contre les sous-domaines R2 et R3 contenant les 2 motifs PHFs. Par la suite, ce VHH a été optimisé par mutagenèse aléatoire pour permettre son expression intracellulaire. Le VHH Z70 a été obtenu et la conservation de l'épitope a été validée par RMN. De manière intéressante, le VHH Z70 présente une affinité plus haute pour Tau que le VHH E4-1. Afin de déterminer de manière plus précise l'épitope de Z70, une banque de fragments de Tau a été générée puis criblée par double hybride. Les résultats ont permis de définir l'épitope minimal du VHH Z70 correspondant à $_{305}\text{SVQIVYKPV}_{313}$ qui inclut le motif PHF6 (R3). Le VHH Z70, en ciblant ce motif, inhibe de façon plus importante l'agrégation de la protéine Tau que le VHH E4-1 dans un système *in vitro* et bloque le phénomène de nucléation du MTBD de Tau dans un modèle cellulaire de « seeding ». Ces travaux démontrent le potentiel des VHHs en tant qu'outils thérapeutiques pour traiter les tauopathies.

ii. Publication

Inhibition of Tau aggregation by targeting its nucleation core with a fragment of camelid heavy-chain-only antibody

Clément Danis^{1,2*}, Elian Dupré^{1*}, Marie Albert², Alexis Arrial³, François-Xavier Cantrelle¹, Sabiha Eddarkaoui², Anne Loyens², Séverine Bégard², Raphaëlle Caillierez², Hamida Merzougui¹, Jean-Christophe Rain³, Morvane Colin², Xavier Hanouille¹, Luc Buée^{2§‡}, Isabelle Landrieu^{1§‡}

¹Univ. Lille, CNRS UMR8576, F-59000 Lille, France

²Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, UMRS1172, F-59000 Lille, France

³Hybrigenic Services, Paris, France

*, § Equal contributions

‡Corresponding authors: Dr Isabelle Landrieu, isabelle.landrieu@univ-lille1.fr, Dr Luc Buée luc.buee@inserm.fr

Keywords, protein-protein interaction, immunotherapy, aggregation, nuclear magnetic resonance spectroscopy, Alzheimer's disease, Tau, VHH

Abbreviations: AD: Alzheimer's disease; HSQC: heteronuclear single quantum correlation; MTBD = RD: Tau microtubule binding domain = Tau repeat domain; NFTs: neurofibrillary tangles; NMR: nuclear magnetic resonance PHF: paired helical filament; SFs: straight filaments; SPR: surface plasmon resonance TEM: Transmission Electron Microscopy; VHH: Variable Heavy-chain of the Heavy-chain only antibody

Abstract

Tau proteins aggregate into filaments in brain cells in Alzheimer's disease and related disorders referred to as tauopathies. Here, we used fragments of camelid heavy-chain-only antibodies (VHHs) targeting Tau as immuno-modulators of its aggregation. A synthetic phage-display library of VHHs was screened against Tau. The epitopes recognized by the selected VHHs were defined using Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, allowing the selection of a VHH targeting the microtubule-binding domain, composing the core of Tau fibrils. This lead VHH was optimized using yeast two-hybrid to improve its biochemical properties, resulting in VHH Z70. VHH Z70 was more efficient than the lead and fully inhibited *in vitro* Tau aggregation in heparin-induced assays. Finally, expression of VHH Z70 in a cellular model of Tau seeding decreased the fluorescence-reported aggregation. VHH Z70, by targeting Tau aggregation, provides a new tool to explore strategies of immunotherapy in tauopathies.

Introduction

Aggregation of the intrinsically disordered neuronal Tau protein to form fibrillar amyloid structures is related to neurodegenerative disorders called tauopathies, including the most prevalent, Alzheimer's disease (AD). AD is characterized by both extracellular amyloid deposits made of A β (amyloid) peptides and intraneuronal neurofibrillary tangles (NFTs) formed by Tau protein aggregates (Goedert and Spillantini 2006). Intervention strategies based on the A β hypothesis had, up to date, limited success despite their being the primary target of clinical assays (Cummings et al. 2017). In AD, the severity of cognitive decline is better correlated with the evolution of neurofibrillary tangles (NFTs) than amyloid deposits (Nelson et al. 2012; Schwarz et al. 2016; Wilcock and Esiri 1982). This emphasizes the need to pursue other biological hypotheses, including the Tau pathway, in search for disease-mitigating treatments for AD and the others tauopathies.

In the pathological context, Tau is the principal component of paired helical filaments (PHFs) and straight filaments (SFs), which form the intracellular fibrillar deposits leading to the NFTs and ultimately to neurofibrillary degeneration. The longest Tau isoform constituted of 441-amino acid residues can be divided into 4 domains comprising the N-terminal domain (N1-N2), the proline-rich domain (P1-P2), the microtubule-binding domain (MTBD) constituted itself of 4 partially repeated regions, R1 to R4, and the C-terminal domain (Fig. 1C). Two homologous hexapeptides named PHF6* (₂₇₅VQIINK₂₈₀) and PHF6 (₃₀₆VQIVYK₃₁₁) located at the start of R2 and R3 repeat regions (Fig. 1C) of Tau MTBD are nuclei of Tau aggregation (von Bergen et al. 2000), PHF6* being the stronger driver of aggregation (Seidler et al. 2018). PHF6* and PHF6 peptides spontaneously aggregate in solution contrary to the full-length Tau that is a highly soluble protein. Their atomic structures reveal the capacity of these segments to form interdigitated steric-zipper interfaces that seed Tau aggregation (Sawaya et al. 2007; Seidler et al. 2018). In addition, the first structures of PHF and SF coming from Tau fibers isolated from AD's brain patients were resolved by cryo-electron microscopy. The core of these fibrillary structures are composed of the subdomains R3

including the PHF6, R4 and a part of the C-terminal domain (V306-F378) that mainly form a β -sheet structure (Fitzpatrick et al. 2017). Although the mechanisms leading to these pathological Tau species is not clearly understood, different molecular features have been identified as involved in the aggregation process including specific mutations identified in frontotemporal dementia (Ghetti et al. 2015), specific pattern(s) of phosphorylation (Despres et al. 2017), acetylation (Cohen et al. 2011) and Tau N- and C-terminal truncations (Derisbourg et al. 2015; Guillozet-Bongaarts et al. 2007; Novak, Kabat, and Wischik 1993). Tau aggregates are toxic at several levels. First, the PHFs disrupt the cellular function upon accumulation at the disease late stages. In addition, it has also become clear in recent years that extracellular Tau aggregates are taken up in cells, leading to intracellular Tau seeding (Clavaguera et al. 2009; Evans et al. 2018; Frost, Jacks, and Diamond 2009; Sanders et al. 2014). Finally aggregation depletes Tau protein from its physiological function. The neuronal Tau protein has been historically described as a cytosolic protein principally localized in axons and involved in the regulation of tubulin polymerization and microtubule stability (Weingarten et al. 1975). This early view has been amended by studies that revealed the multifunctional character of this protein, which is involved in many biological processes, showed various sub-localization including the nuclear compartment, extracellular medium and dendrites (Hoover et al. 2010; Katsinelos et al. 2018; Sultan et al. 2011; Wang et al. 2017). In pathological conditions, the formation of Tau aggregates leads to the dysregulation of all its relative functions. These new findings generated new hypotheses in the understanding of the pathological consequences of Tau aggregation. However, the related search for in-depth comprehension of the Tau physiopathology and effective therapies remains a challenging task. Advances in the field of neurodegeneration require development of new experimental tools that may help to decipher key aspects of tauopathies.

Here, we used VHHs (Variable Heavy-chain of the Heavy-chain-only antibody), also called fragments of camelid heavy-chain-only antibodies, for targeting Tau and preventing its aggregation. VHHs are constituted of an unique heavy-chain that corresponds to the variable heavy-chain from *Camelidae* immunoglobulin G (Hamers-Casterman et al. 1993). They can

be modified to penetrate into the cytoplasm of cells, or expressed inside the cells, and bind specifically to their target epitope (Herce et al. 2017; Li, Bourgeois, et al. 2016). In addition, due to their small size, VHHs have been described to cross the blood-brain-barrier more easily than classical antibodies. We generated, optimized and characterized a VHH targeted against Tau MTBD, obtained by screening from a naive synthetic library. The optimized version of this lead VHH inhibits Tau aggregation *in vitro* and in HEK 293 aggregation-reporting cellular model, providing a new tool to define the best strategies in Tau immunotherapies.

Results

Identification of a synthetic VHH directed against Tau microtubule-binding domain

A synthetic phage-display library of humanized llama single-domain antibody (Moutel et al., 2016) was screened against a preparation of biotinylated recombinant full-length Tau protein, corresponding to its longest isoform (Tau 2N4R, designated as Tau). After validation with non-absorbed phage ELISA, 20 clones were selected from the screen for further analysis. We used nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to identify the epitope site recognized by each of the validated VHHs, based on resonance perturbation mapping in ^1H , ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N -Tau. Interaction was visualized as a perturbation of resonance that can be a modification of the chemical shift value or of the peak intensity when comparing spectra of Tau alone in solution or in the presence of a VHH. As most of the resonances from the ^1H , ^{15}N spectrum of Tau have been assigned (Lippens et al. 2006; Mukrasch et al. 2009), each perturbation can be linked to a specific amino acid residue in Tau sequence. One VHH, named VHH E4-1, affected resonances in Tau spectrum corresponding to residues in the MTBD (Fig.1). In the spectrum of Tau in the presence of VHH E4-1, a number of resonances are broadened beyond detection compared to the Tau control spectrum (Fig. 1A-B). Intensity ratios of corresponding resonances in these two spectra, plotted along the Tau sequence, allowed the identification of the Tau MTBD domain as the target of VHH E4-1 interaction (Fig. 1C). The epitope mapping was refined using a Tau fragment that corresponded to the isolated MTBD. The smaller size of this Tau fragment resulted in less resonance overlap in the corresponding Tau[245-368] ^1H , ^{15}N spectrum and made identification of the binding site easier (Supplementary Fig. 1-2). The affected resonances corresponded to amino acid residues located in a stretch expanding from residue V275 to K317 (Supplementary Fig. 2B). VHH E4-1 thus bound within the R2-R3 repeats of the MTBD.

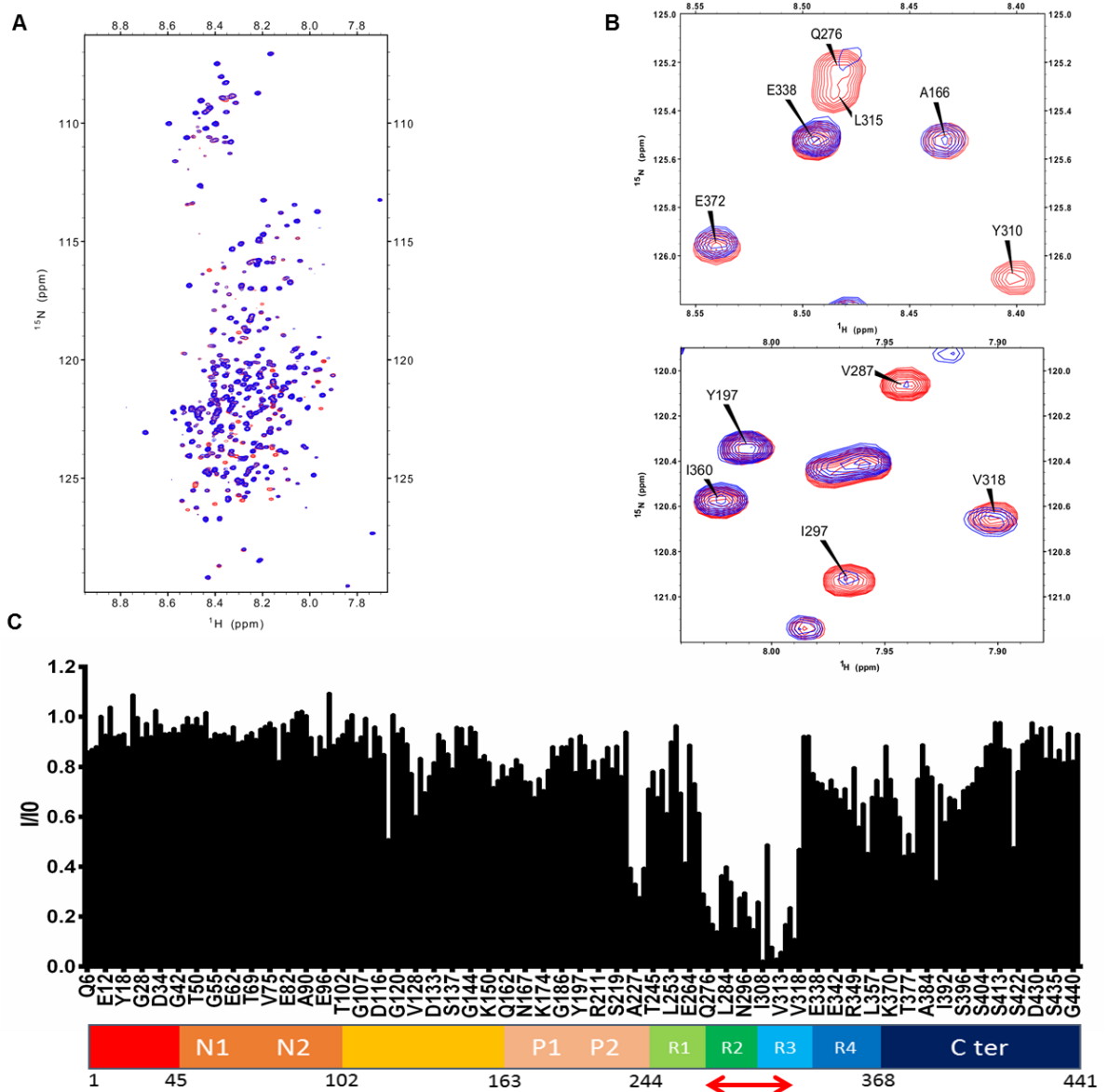


Fig. 1 VHH E4-1 binds to the MTBD of Tau. **A:** Overlay of two-dimensional ^1H , ^{15}N HSQC spectra of Tau (in red) with Tau mixed with non-labelled VHH E4-1 (overlaid in blue) ($n=1$). **B:** Spectra enlargements showing broadened resonances corresponding to residues implicated in the interaction. **C:** Normalized intensities I/I_0 of corresponding resonances in the two-dimensional spectra of Tau with equimolar quantity of VHH E4-1 (I) or free in solution (I_0) for residues along the Tau sequence. Overlapping resonances are not considered (x -axis is not scaled). A red double-arrow indicates the region containing the corresponding major broadened resonances, which was mapped to the R2-R3 repeats in the MTBD.

Optimization of lead VHH E4-1 into variant VHH Z70

An important property of a VHH is its capacity to be produced and to recognize its targets in the cytoplasmic environment, inside the cells. However, VHHs might not all be efficient once expressed in a cell, due to improper folding and/or poor stability. Indeed, VHH E4-1 proved to be a poor binder of Tau when using Yeast 2-Hybrid to test its intracellular binding capacity (Tanaka and Rabbitts 2003; Vielemeyer et al. 2010) (Fig. 2A). VHH E4-1 was thus next submitted to a round of optimization, using yeast two-hybrid system, to maximize its capacity to recognize its target when expressed in a cellular environment. First, we built a cDNA mutant library by random mutagenesis, targeting the whole sequence of VHH E4-1 to produce a variety of VHH preys (C-terminal Gal4-activation domain fusion) against the Tau bait (N-terminal LexA fusion). The library was transformed in yeast and screen by cell-to-cell mating to get positive colonies in conditions corresponding to undetected VHH E4-1-Tau interaction (Fig. 2A). An optimized mutant, named VHH Z70, was selected, resulting from 4 mutations G12V, P16S, T81M and W114G located in the framework domains, outside the recognition loops or CDR (Fig. 2A-B), suggesting that the epitope recognized by this mutant is unaltered. Conservation of the epitope was confirmed by resonance perturbation mapping, using labelled MTBD in the same manner as for the lead VHH E4-1 (Supplementary Fig. 3A-B). Interaction of VHH E4-1 and VHH Z70 with Tau were further characterized using surface plasmon resonance spectroscopy (SPR) with biotinylated-Tau immobilized at the surface of a streptavidin-functionalized chip. The assay provided the kinetic parameters of the interaction, characterized by dissociation constants K_d of 345 nM for VHH E4-1 (Fig. 2C) and of 147 nM for mutant VHH Z70 (Fig. 2D). VHH Z70, optimized for intracellular activity, had a better affinity for its target than VHH E4-1, the major optimization concerning the association constant (k_{on}) (Supplementary Fig. 4). SPR was additionally performed with VHH Z70 immobilized on the chips. A fusion protein corresponding to a SUMO domain fused at its C-terminus to a Tau peptide [273-318], corresponding to the identified VHH binding site, was injected into the flux. VHH Z70 interacted with the fused peptide with a K_d of 85 nM (Fig.

2E, Supplementary Fig. 4), confirming that the region 275 to 317 in Tau sequence was sufficient for VHH-Z70 binding.

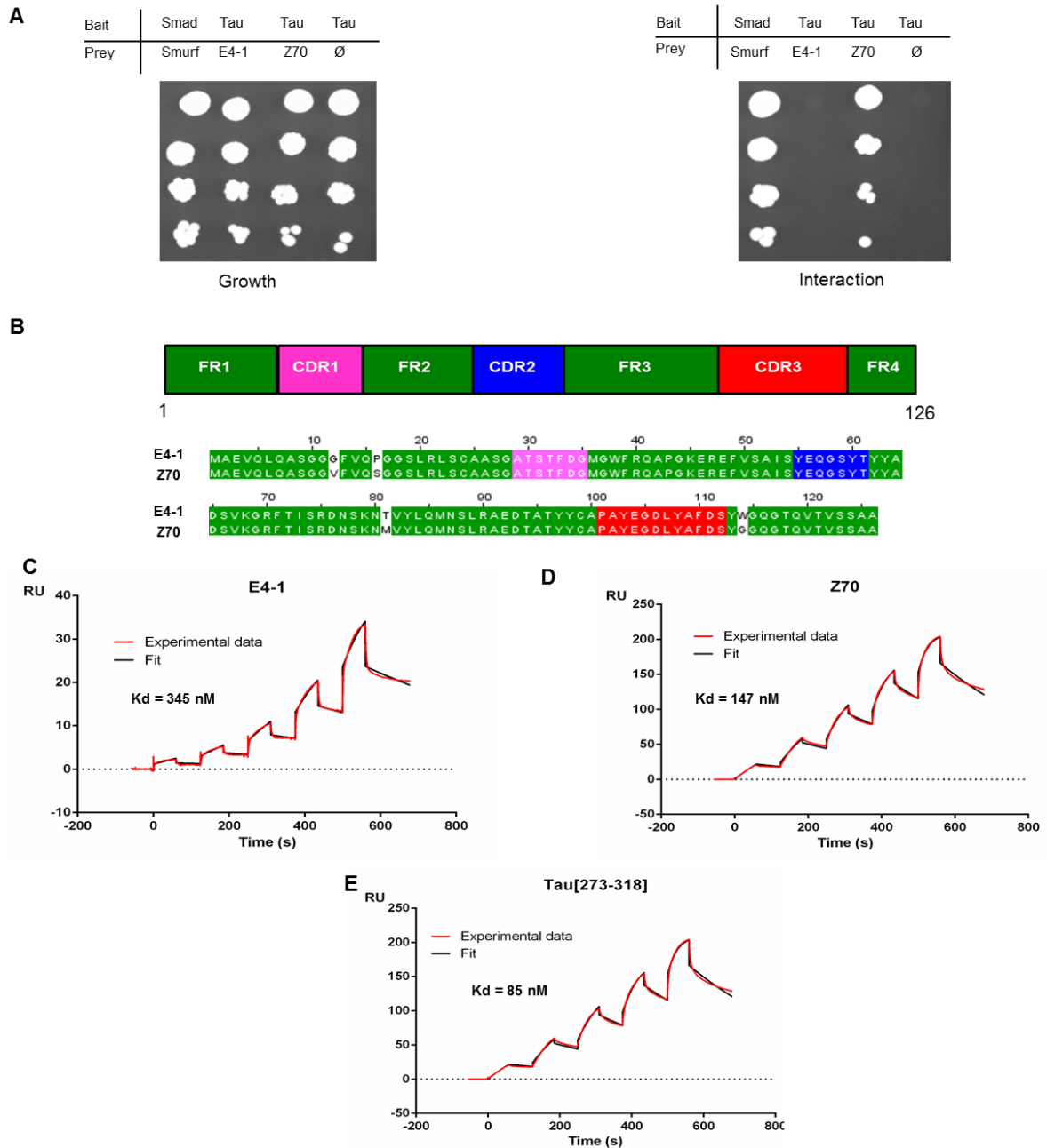


Fig. 2 VHH Z70 is optimized for intracellular activity and has a better affinity for Tau than VHH E4-1. **A:** Results from yeast two-hybrid. A growth test on non-selective medium (*left panel*, lacking only leucine and tryptophane) or on selective medium (*right panel*, lacking leucine, tryptophane and histidine) was performed with dilutions 1/10, 1/100, 1/1000 and 1/10000 (*top to bottom*) of the diploid yeast culture expressing both bait and prey constructs. Positive and negative controls of interaction consist respectively in Smad/Smurf interaction (Zhang et al. 2001) and Tau alone (empty vector). VHH E4-1 did not interact with Tau in yeast whereas VHH Z70 did. **B:** Structure of the VHHs and sequence alignment between VHH E4-1 and VHH Z70 resulting in 4 mutations in the framework domains : G12V, P16S, T81M and W114G. **C, D:** Sensorgrams (reference subtracted data) of single cycle kinetics analysis performed on immobilized biotinylated Tau, with five injections of VHH at 0,125 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, and 2 μ M. **C** of VHH E4-1 and **D** of VHH Z70 ($n=1$). Dissociation equilibrium constant K_d were calculated from the ratio of off-rate and on-rate kinetic constants k_{off}/k_{on} (Supplementary Fig. 4). **E:** Sensorgram (reference subtracted data) of single-cycle kinetics analysis performed on immobilized VHH Z70 on a CM5 chip, with five injections of SUMO-Tau peptide Tau[273-318] ($n=1$). Tau peptide sequence and, k_{on} , k_{off} and K_d are included in the table in Supplementary Fig. 4. Red line corresponds to the fit curve, black line to the measurement.

Identification of the minimal Tau epitope recognized by VHH Z70

The binding site identified by NMR for both lead VHH E4-1 and optimized VHH Z70 was larger than expected for an epitope, about 40 contiguous amino-acid residues showing strong reduction of their resonance intensities (275 to 317). However, the NMR epitope mapping by resonance intensity decrease does not allow identification of the residues in a direct interaction. The decrease in resonance intensity can result from local immobilization of the disordered protein due to the binding, decreasing local tumbling and increasing relaxation. Accordingly, the Tau domain involved in the VHH interaction, which contained the PHF6 and PHF6*, was described as presenting local extended secondary structure (Mukrasch et al. 2009) and thus represented a relatively rigid stretch that could explain the extended region of immobilization upon binding. Alternatively, decrease resonance intensity can be due to chemical exchange between bound and unbound states that can result in line broadening, depending on the affinity and chemical shift change resulting from the interaction. In this case, the observed binding in the repeat region of Tau, given the level of sequence redundancy, could correspond to binding to R2 or R3 repeats, even if one is a secondary site of low affinity. To lift the ambiguity, and determine the minimal epitope that VHH Z70 can recognize, an epitope mapping was performed using yeast 2-hybrid (267.10^3 tested interactions) with a library of Tau fragments as preys (GAL4_activation domain-Tau_fragments), and VHH Z70 as bait (LexA-VHH fusion). 90 positive clones were selected from a small-scale cell-to-cell mating screen. Comparison of the Tau prey fragment sequences corresponding to these 90 interactions identified peptide $_{305}\text{SVQIVYKPV}_{313}$ as the minimal recognition sequence of Tau that VHH Z70 can bind (Supplementary Fig. 5). The sequence is localized in the R3 repeat of the MTBD domain and contains the PHF6 peptide VQIVYK. We next used Tau2N3R isoform, which lacks the R2 repeat and so does not contain the PHF6* peptide, to confirm that the R3 repeat, containing the PHF6 peptide, was sufficient for the interaction. As observed in the resonance intensity profile, the interaction of VHH Z70 with Tau2N3R is maintained, and the most affected resonances in the Tau spectrum corresponded to the PHF6 residues in the R3 repeats (Supplementary Fig. 6).

Inhibition of *in vitro* Tau aggregation

VHHs E4-1 and VHH Z70 recognizing Tau peptide PHF6, known to nucleate the aggregation and to form the core of Tau fibers, were assayed for their capacity to interfere with Tau *in vitro* aggregation. The assays were carried out with Tau recombinant protein in the presence of heparin, using thioflavin T as a dye whose fluorescence is increased in presence of aggregates (Fig. 3). Negative and positive controls consisted in Tau without or with heparin, respectively. An additional control was performed in the presence of VHH F8-2, a VHH issued from the initial phage-library screen, which targeted Tau C-terminal domain (Supplementary Fig. 7). At 10 μ M of Tau, the observed amount of aggregates was maximal (defined as 100%) for the positive control after 8 h of incubation at 37°C, while no fluorescence change was detected for the negative control (Fig. 3A-C). At equimolar concentration of Tau:VHH F8-2, the fluorescence signal reached 91,2 % (\pm 3.8%), showing that VHH F8-2 did not affect the aggregation of Tau (Fig. 3A). In contrast, at a molar ratio of 1:0.25 Tau:VHH E4-1, the maximal fluorescence signal reached 86,9 % (\pm 2.4%). Additionally, about 3.8h were needed to gain 50% of maximal signal, compare to 2.5h for the positive control, showing a slower aggregation kinetic in the presence of VHH E4-1 (Fig. 3B). At a 1:1 Tau:VHH E4-1 molar ratio, the fluorescence signal only reached 58.3 % (\pm 3.9%) and more than 12.8h were necessary to gain 50% of maximal signal (Fig. 3B). VHH Z70 had an even stronger inhibition effect on the aggregation of Tau than the lead VHH E4-1. At a 1:1 Tau:VHH Z70 molar ratio, the maximal fluorescence signal barely reached above the negative control level, at 4.1 % (\pm 0.1%) (Fig. 3C). The link between the thioflavin T fluorescence measurements in our assays and the formation of Tau aggregates at the end point of each aggregation assay was confirmed by Transmission Electron Microscopy (TEM) imaging that allowed direct visualization of typical Tau fibers, whether present (Fig. 3D-H). Large amounts of fibrils were observed for Tau in the presence of heparin only (Fig. 3E) or in the additional presence of VHH F8-2 (Fig. 3F), but shorter filaments with VHH E4-1 (Fig. 3G) and practically none with VHH Z70 (Fig. 3H). In conclusion, lead VHH E4-1 and its

optimized variant VHH Z70 had both the capacity to inhibit the aggregation of Tau *in vitro* and their relative activity is related to their affinity for Tau.

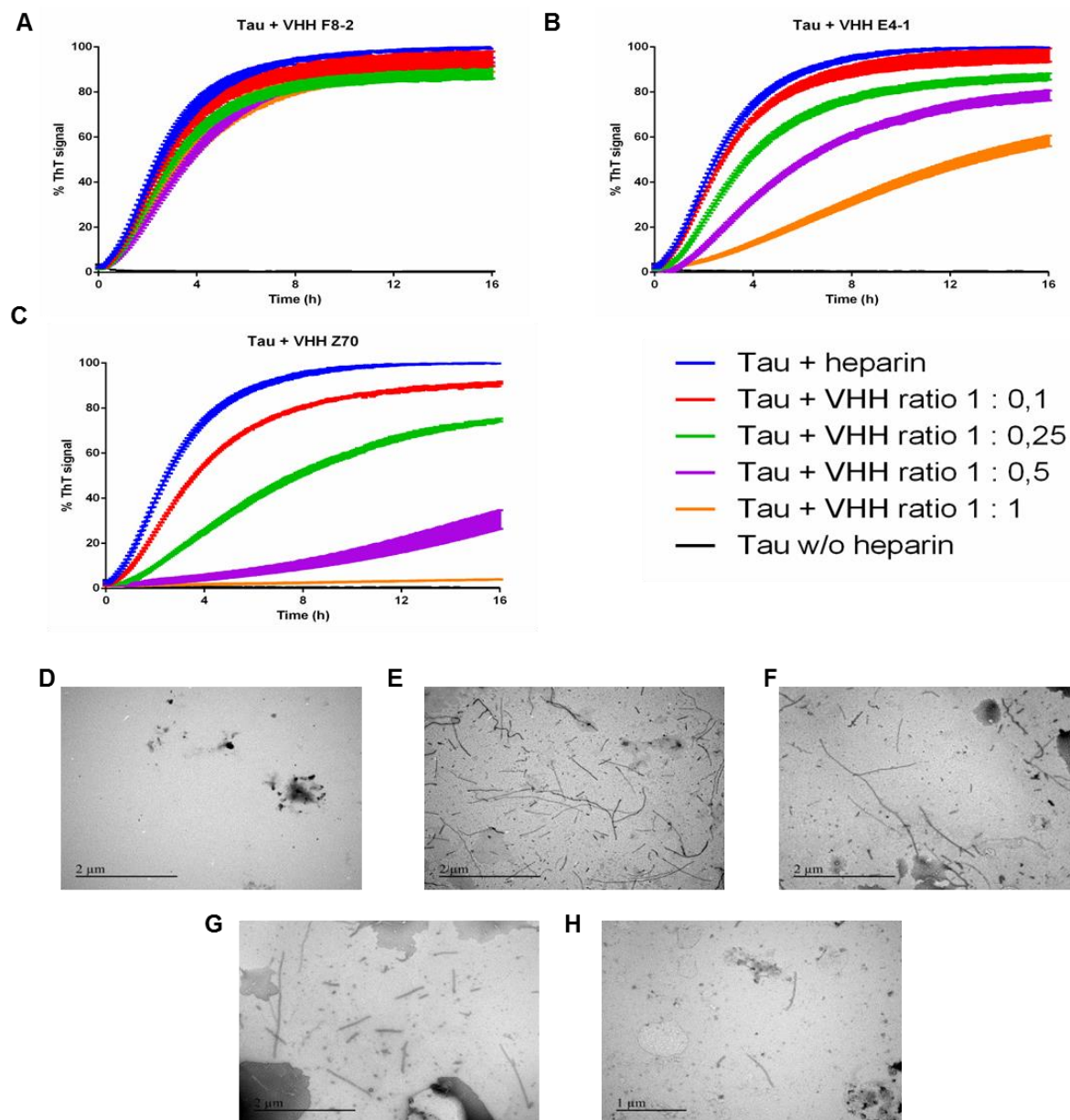


Fig. 3 VHH E4-1 and VHH Z70 inhibit *in vitro* Tau aggregation. Aggregation of Tau (10 μM) in the absence of heparin (black curve), in the presence of heparin and of increasing concentration of **A:** VHH F8-2 **B:** VHH E4-1 and **C:** VHH Z70 (0, 1, 2,5, 5 and 10 μM) followed by Thioflavin T fluorescence at 490 nm (n=3). Error bars: s.e.m, **D-H:** TEM images at the end point of the aggregation assays. **D:** in the absence of heparin or **E:** in the presence of heparin and **F-H** in the presence of heparin and additional presence of **F** VHH F8-2 **G** VHH E4-1 **H** VHH Z70 (for Tau/VHH molar ratio of 1 : 1) (n=2).

Inhibition of Tau seeding in HEK293 Tau repeat domain (RD) P301S FRET

Biosensor aggregation reporter cells

The capacity of VHH E4-1 and VHH Z70 to block the intracellular aggregation in the HEK293 Tau RD P301S FRET Biosensor reporter cell line model was next investigated. This cell line constitutively expresses Tau RD (MTBD), with a P301S mutation, fused to either CFP (Cyan Fluorescent Protein) or YFP (Yellow Fluorescent Protein) that together generate a FRET (Forster Resonance Energy Transfer) signal upon MTBD-P301S aggregation (Holmes et al. 2014). For cells treated with HEPES buffer only, FRET signal is detected neither by confocal microscopy nor by flow cytometry (Fig. 4A-B). The intracellular aggregation of MTBD-P301S protein is induced by treating the cells with Tau seeds, the MTBD fragment *in vitro* aggregated in HEPES buffer with heparin associated to liposomes to help cell penetration (Holmes et al. 2014), leading to a FRET signal (yellow fluorescence by confocal and $16\% \pm 0.8\%$ FRET-gated positive cells, Fig. 4C-D-E). In addition, mCherry-VHH F8-2 was transfected and served as negative control since its binding is outside the MTBD (Supplementary Fig. 7). Similarly to the previous experiment in the absence of any VHH, $15.4\% \pm 1\%$ FRET-gated positive cells were visualized after Tau seeding (Fig. 4E), providing a reference for 100% seeding. To evaluate the efficiency of VHHs E4-1 and Z70 to inhibit aggregation in this model, plasmids that expressed each VHH fused to mCherry protein were transfected one day prior to addition of the Tau seeds (Fig. 4F-G). With a mCherry gate to detect FRET signal selectively in mCherry-VHH positive cells, the percentage of FRET positive cells transfected by mCherry VHHs E4-1 and Z70 were compared to the cells transfected by mCherry VHH F8-2, which did not affect the seeding in cells (Fig 4E). The FRET signal reduction for mCherry-VHH E4-1 positive cells was not significant, with a percentage of FRET positive cells decreasing to $15.6 \pm 0.9\%$, compare to $18.5 \pm 1.3\%$ FRET signal for mCherry-VHH F8-2—negative control (15.7% seeding inhibition, Fig. 4H-I-J). Conversely, mCherry-VHH Z70 clearly affected the intracellular aggregation of MTBD-P301S, as the observed FRET signal for the corresponding transfected cells was significantly decreased to $10.9 \pm 0.7\%$ (41% seeding inhibition, Fig. 4H-I-J)

From all that measurements, we concluded that the amount of intracellular aggregates of MTBD-P301S Tau was reduced by more than 40% in the presence of the mCherry-VHH Z70, showing the efficiency of VHH Z70 to block Tau seeding in this cellular model. The poorer seeding inhibition capacity of VHH-E4-1 is likely due to its poor intracellular activity compared to VHH Z70 (Fig. 2).

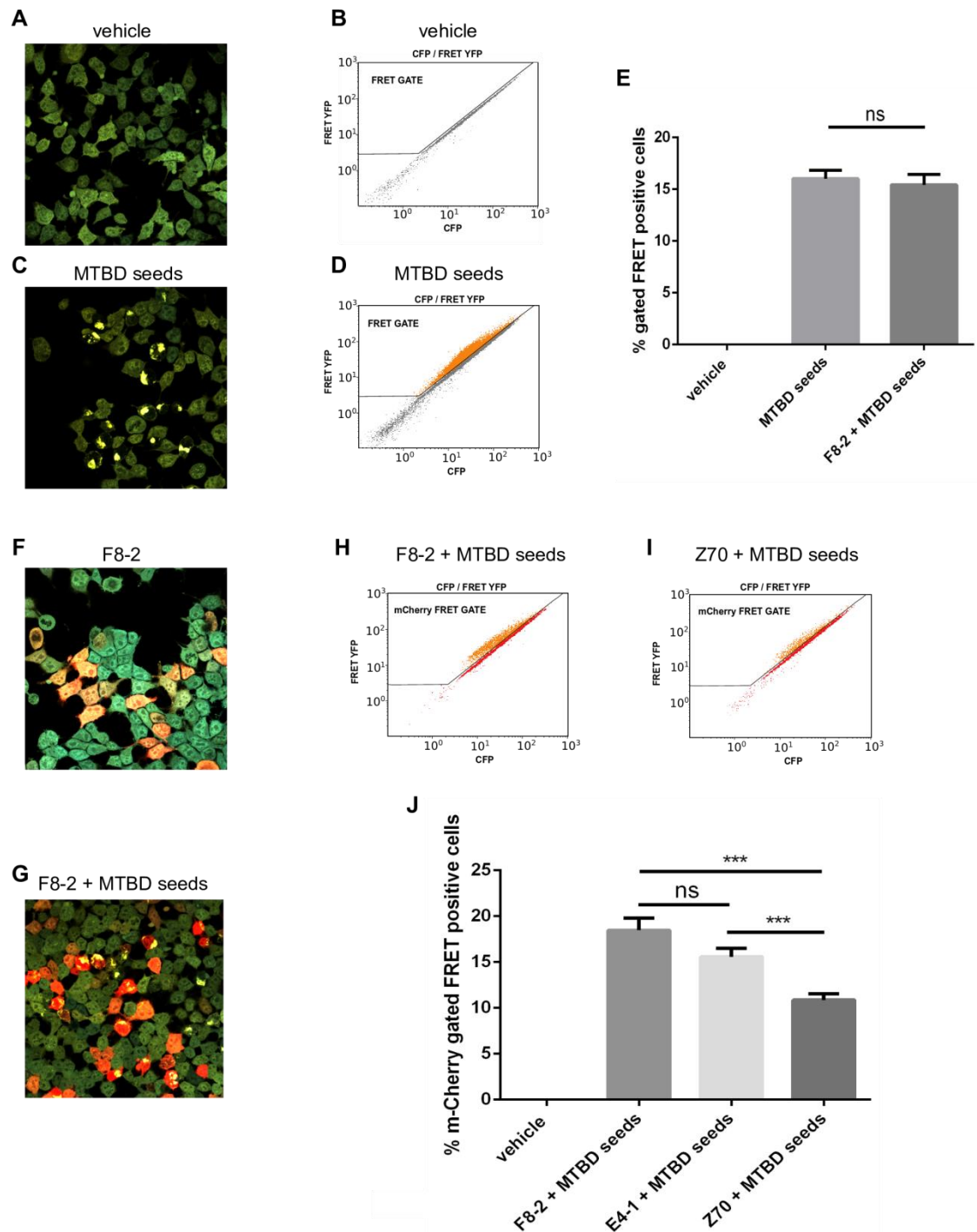


Fig. 4 VHH Z70 blocks intracellular aggregation of Tau MTBD in HEK 293 Tau RD P301S FRET Biosensor cells. **A-D**: Analysis of Tau seeding in HEK 293 Tau RD P301S FRET Biosensor cells **A** by confocal microscopy for cells transfected with vehicle (HEPES buffer), **B** by flow cytometry with a FRET-gate for cells transfected with vehicle, **C** by confocal microscopy for cells transfected with MTBD seeds. Positive cells that have incorporated MTBD seeds show yellow dots by corresponding to FRET signal. **D** by flow cytometry with a FRET-gate for cells transfected with MTBD seeds. **E** Percentage of FRET positive cells determined from FACS data for cells transfected as in **B**, **D** or transfected with mCherry-VHH F8-2 followed by MTBD seeds (n=3). **F-I** Analysis of Tau seeding in HEK 293 Tau RD P301S FRET Biosensor cells. **F-G** by confocal microscopy for cells transfected with **F** mCherry-VHH F8-2 or **G** with mCherry VHH F8-2 followed by MTBD seeds. Cells transfected with mCherry-VHH have a red color, FRET is visualized as yellow dots. **H-I** by flow cytometry with a mCherry FRET gate for cells transfected with **H** mCherry-VHH F8-2 followed by MTBD seeds (n=3) or **I** mCherry-VHH Z70 followed by MTBD seeds (n=3). **J** Percentage of mCherry-gated FRET positive cells, determined from FACS data for cells as in **H**, **I** or for cells transfected with mCherry-VHH E4-1 followed by MTBD seeds (n=3). A significant decrease of FRET signal, reporting a decrease intracellular MTBD aggregation, is observed in the presence of VHH Z70. Error bars: s.e.m ***P<0.001, Mann-Whitney U-test. Error bars: s.e.m.

Discussion

Tau immunotherapy is an attractive strategy in tauopathies to bind to and to clear extracellular and/or intracellular pathological species of the Tau protein to slow disease progression. Indeed, by targeting different Tau epitopes immunotherapy studies showed a reduction of Tau pathology and cognitive deficit in different mouse models of tauopathy (Asuni et al. 2007; Boutajangout, Quartermain, and Sigurdsson 2010; Troquier et al. 2012). In addition, a passive anti-Tau immunotherapy in 3×Tg-AD mice successfully reduced not only Tau pathology, but also inhibited A β pathology (Dai et al. 2017). In accordance with these encouraging studies, different clinical trials are ongoing (Congdon and Sigurdsson 2018).

The interest of using the VHHs instead of the classical antibodies stand in their easy generation, from a synthetic library, involving no animal handling, their selection using phage-display, their production in periplasm of bacteria, as well as the multiple possibilities offered by modification using protein engineering (Pain, Dumont, and Dumoulin 2015). Recently, VHHs showed their potential as diagnostic tools to target NFTs with an affinity and specificity very close to antibodies already used for detecting these pathologic features by immunochemistry, opening the way for new probes in *in vivo* imaging experiments (Li, Vandesquille, et al. 2016).

We here demonstrated that it is also possible to consider VHHs as therapeutic tools in tauopathies. We succeeded in selecting a VHH targeted to a specific region in a rather large protein, in one single screen. Additionally, the properties of this VHH were improved, such that the optimized VHH Z70 variant of the lead VHH E4-1 demonstrated better inhibitory activity both in *in vitro* aggregation assays and in a cellular model of seeding. The affinity reached the 100nM range and remained an important parameter to optimize as we observed a higher anti-aggregation activity for VHH Z70 compared to VHH-E4-1 in the *in vitro* assay.

The main interest is that VHH Z70 binds to the PHF6 in the MTBD, while the majority of epitopes targeted in clinical trial are located in the N- or C-terminal regions (Congdon and Sigurdsson 2018). Recent studies show that targeting N-terminal species could block Tau uptake and its transfer between neurons (Nobuhara et al. 2017), and could reduce

accumulation of Tau in the brain of mouse model of tauopathy (Spencer et al. 2018). Nevertheless, antibodies targeting N- and C-terminal epitopes are probably not able to interfere with aggregation and seeding, other crucial aspects of the pathology (Courade et al. 2018). It is indeed the case for VHH F8-2 that recognized a C-terminal epitope of Tau. Here, we demonstrated the interest of targeting the Tau PHF6 motif, which participates to the aggregation process (von Bergen et al. 2000) and which is found in the core of Tau fibrils in AD (Fitzpatrick et al. 2017). Moreover, a recent study proposes that aggregation of Tau could be initiated by the conversion from an inert monomer to a seed-competent monomer, the later characterized by an increased accessibility of the PHF motifs (Mirbaha et al. 2018). Interestingly, a number of chaperons with Tau anti-aggregation activities, such as Hsc70, Hsp60 and DnaJA2, bind to regions overlapping PHF6, and in a weaker manner PHF6*. Thus, one major mechanism of the anti-aggregation activities of these chaperons is likely the binding of Tau in the PHF region (Mok et al. 2018). Accordingly, blocking the accessibility of the PHF motifs could prevent the seeding of Tau, as here confirmed (Fig. 4). VHH Z70 was indeed able to inhibit efficiently the seeding by blocking the recruitment of the intracellular Tau MTBD.

VHH Z70 will thus be an interesting tool to evaluate whether blocking the intracellular aggregation by its production using a viral expression system in murine brain will be sufficient to additionally block the process of Tau seeding inside the brain. Another interesting feature of a VHH is that, not only can it be expressed intracellularly, but additionally functionalized in the form of a heavy-chain antibody (bivalent) to be secreted in the extracellular space. Taking advantage of this modularity, two different mechanisms of action with both intra- and extracellular Tau targets can be compared to study the contribution of Tau seeding and spreading, respectively, to the pathology. These future investigations could help to focus the clinical trials on the best strategy for immunotherapy targeting Tau in tauopathies.

Materials and methods

Screening and Selection of VHHs directed against Tau protein

Recombinant Tau protein was biotinylated using EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fisher Scientific) using manufacturer conditions except for a two-fold molecular excess of Sulfo-NHS-Biotin. The unreacted Sulfo-NHS-Biotin was eliminated using Prepacked Columns Sepadextran™ 25 Medium SC (Proteigene). The Nali-H1 library of VHHs was screened against the recombinant biotinylated-Tau as described previously (Moutel et al. 2016). Briefly, biotinylated-Tau protein was bound to Dynabeads™ M-280 Streptavidin (Invitrogen) at each round of selection, at a concentration gradually decreased: 100nM in round1, 50nM in round 2 and 10nM in round3. Biotinylated-Tau binding was verified by Western Blot using Streptavidin Protein, HRP (Thermo Fisher Scientific). 3×10^{11} phages of the Nali-H1 library were used in the first round of selection. After the third round, 186 clones were randomly picked and tested in non-absorbed Phage ELISA assay using avidin-plates and biotinylated-Tau Antigen (5µg/ml) for cross-validation (Matz and Chames 2012).

Production and purification of VHHs

Competent *Escherichia coli* BL21 (DE3) bacterial cells were transformed with the various PHEN2-VHH constructs. Recombinant *E.coli* cells produced proteins targeted to the periplasm after induction by 1 mM IPTG (isopropylthiogalactoside). Production was pursued for 4 hours at 28°C before centrifugation to collect the cell pellet. Pellet was suspended in 200 mM Tris-HCl, 500 mM sucrose, 0.5 mM EDTA, pH 8 and incubated 30 min on ice. 50 mM Tris-HCl, 125 mM sucrose, 0,125 mM EDTA, pH 8 and complete protease inhibitor (Roche) were then added to the cells suspension and incubation continued 30 min on ice. After centrifugation, the supernatant, corresponding to the periplasmic extract, was recovered. The VHHs were purified by immobilized-metal affinity chromatography (HisTrap HP, 1mL, GE healthcare) followed by size exclusion chromatography (Hiload 16/60, Superdex 75, prep grade, GE healthcare) in NMR buffer (50 mM NaPi pH 6.7, 30 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT).

Production and purification of labelled ^{15}N Tau 2N4R, ^{15}N Tau 2N3R and ^{15}N Tau

MTBD

pET15b-Tau recombinant T7lac expression plasmid was transformed into competent *E.coli* BL21 (DE3) bacterial cells. A small scale culture was grown in LB medium at 37 °C and was added at 1:10 V/V to 1L of a modified M9 medium containing MEM vitamin mix 1X (Sigma-Aldrich), 4g of glucose, 1 g of ^{15}N -NH₄Cl (Sigma-Aldrich), 0.5 g of ^{15}N -enriched ISOGROW (Sigma-Aldrich), 0.1 mM CaCl₂ and 2 mM MgSO₄. Recombinant ^{15}N Tau production was induced with 0.5 mM IPTG when the culture reached an optical density at 600nm of 0.8. Proteins were first purified by heating the bacterial extract, obtained in 50 mM phosphate buffer pH 6.5, 2.5 mM EDTA and supplemented with complete protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich), 15 min at 75 °C. The resulting supernatant was next passed on a cation exchange chromatography column (Hitrap SP sepharose FF, 5mL, GE healthcare) with 50 mM sodium phosphate buffer (NaPi) pH 6.5 and eluted with a NaCl gradient. Tau proteins were buffer-exchanged against 50 mM ammonium bicarbonate (Hiload 16/60 desalting column, GE Healthcare) for lyophilization. The same protocol was used to produce and purify Tau 2N3R isoform and Tau[245-368] (designated MTBD, also called K18 fragment). Detailed procedure can be found in (Danis et al. 2016).

Production and purification of SUMO-Tau peptides

cDNA encoding peptides Tau[273-318], was amplified from Tau 2N4R cDNA by PCR. cDNA was cloned by a ligation independent protocol into vector pETNKI-HisSUMO3-LIC as described in (Luna-Vargas et al. 2011). Tau peptide was expressed as N-terminal SUMO protein fusion with a N-terminal HisTag. His-SUMO-Tau peptide was purified by affinity chromatography on Ni-NTA resin followed by size exclusion chromatography (Hiload 16/60, Superdex 75, prep grade, GE healthcare) in SPR buffer (HBS-EP+, GE Healthcare).

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Experiments

Analysis of the ^{15}N Tau/VHH interactions were performed at 298K on a Bruker 900MHz spectrometer equipped with cryogenic probe. TMSP (trimethyl silyl propionate) was used as internal reference. Lyophilized ^{15}N Tau were diluted in a buffer containing 50 mM NaPi, 30

mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 mM DTT, and 10% D₂O, pH 6.7 and mixed with VHH at 100 μM final concentration for each protein. 200 μL of each mix in 3 mm tubes were sufficient to obtain the 2D ¹H, ¹⁵N HSQC spectra. ¹H, ¹⁵N HSQC were acquired with 3072 and 416 points in the direct and indirect dimensions, respectively for 12.6 and 25 ppm, in the ¹H and ¹⁵N dimensions, respectively, with 32 scans. Data were processed with Bruker Topspin and analyzed with Sparky (T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco).

Optimization of VHH E4-1 for intracellular expression

VHH E4-1 was amplified from pHEN2 plasmid (oligonucleotides 3390 and 3880 in Supplementary Fig. 8) using Taq polymerase with 14 mM MgCl₂ and 0.2 mM MnCl₂ and a modified nucleotide pool according to (Cadwell and Joyce 1992). The amplified cDNAs were transformed in yeast Y187 strain, together with a digested empty derivative of pGADGH vector (Bartel P.L and Sternglanz R 1993), allowing recombination by gap repair in the vector. The VHH cDNAs are expressed as preys, with an N-terminal Gal4-activation domain fusion (E4-1-Gal4AD). A library of 2.1 million clones was obtained, collected and aliquoted. Tau variant 0N4R isoform (NM_016834.4) was expressed as bait with an N-terminal fusion with lexA (Tau-LexA) from pB29 vector, which is derived from the original pBTM116 (Vojtek and Hollenberg 1995). The library was screened at saturation, with 20 million tested diploids, using cell-to-cell mating protocol (Fromont-Racine, Rain, and Legrain 1997). A single clone was selected, named VHH Z70. A one-to-one mating assay was used to test for interaction using a mating protocol with L40ΔGal4 (mata) transformed with the bait and Y187 (matα) yeast strains transformed with the prey (Fromont-Racine, Rain, and Legrain 1997). The interaction pairs were tested in triplicate on selective media by streak.

Tau fragment library construction

Tau cDNA (NM_016834.4) was amplified from Tau-LexA bait vector (oligonucleotides 6690 and 6972 Supplementary Fig. 8). 5 μg of the PCR product was subjected to Fragmentase® treatment (New England Biolab, NEB) until a smear of fragments was detected around 400-500pb by agarose gel electrophoresis. The DNA fragments were purified by

phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. The DNA fragments were next subjected to end repair (NEB) and dA-tailing adaptation, using Blunt/TA ligase master mix with NEBNext® Adaptor hairpin loop (NEB), followed by AMPure XP bead (Beckman Coulter) purification. After USER® enzyme digestion (NEB), DNA fragments were amplified (oligonucleotides 10829 and 10830 in Supplementary Fig. 8) with 15 cycles of PCR using NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix (NEB), which allowed to add Gap Repair recombination sequences for the cloning in Gal4-AD prey plasmid pP7. The library comprised 50000 independent clones.

Tau fragment library screening

The coding sequence for VHH Z70 was PCR-amplified and cloned into pB27 as a C-terminal fusion to LexA (LexA-VHHZ70). The construct was used to produce a bait to screen the Tau fragments library constructed into pP7. pB27 and pP7 derived from the original pBTM116 (Vojtek and Hollenberg 1995) and pGADGH (Bartel P.L and Sternglanz R 1993) plasmids, respectively. The Tau fragment library was screened using a mating approach with YHGX13 (Y187 *ade2-101::loxP-kanMX-loxP*, *mata*) and L40ΔGal4 (*mata*) yeast strains (Fromont-Racine, Rain, and Legrain 1997). 90 His⁺ colonies corresponding to 267.10³ tested diploids were selected on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions.

Surface Plasmon Resonance experiments

Affinity measurements were performed on a BIAcore T200 optical biosensor instrument (GE Healthcare). Recombinant Tau proteins were biotinylated with 5 molar excess of NHS-biotin conjugates (ThermoFisher) during 4 hours at 4 °C. Capture of biotinylated Tau was performed on a streptavidin SA sensorchip in HBS-EP+ buffer (GE Healthcare). One flow cell was used as a reference to evaluate nonspecific binding and provide background correction. Biotinylated-Tau was injected at a flow-rate of 30 μL/min, until the total amount of captured Tau reached 500 resonance units (RUs). VHHS were injected sequentially with increasing concentrations ranging between 0.125 and 2 μM in a single cycle, with regeneration (3 successive washes of 1M NaCl) between each VHH. On the other hand, VHH Z70 was

immobilized on a CM5 chip in HBS-EP+ buffer (GE Healthcare) and increasing concentrations, ranging between 0,125 and 2 μ M of the SUMO-Tau peptide, were successively injected. Single-Cycle Kinetics (SCK) analysis⁵² was performed to determine association k_{on} and dissociation K_{off} rate constants by curve fitting of the sensorgrams using the 1:1 Langmuir model of interaction of the BIAevaluation software 2.0 (GE Healthcare). Dissociation equilibrium constants (K_D) was calculated as K_{off}/k_{on} .

***In vitro* kinetic aggregation assays**

Tau 2N4R aggregation assays were performed with 10 μ M Tau and with increasing concentrations of VHHs (between 0 and 10 μ M) in buffer containing 50 mM MES pH 6.9, 30 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 0.33mM freshly prepared DTT, 2.5 mM heparin H3 (Sigma-Aldrich) and 50 μ M Thioflavin T (Sigma-Aldrich), at 37°C. Experiments were reproduced 3 times in triplicates for each condition. The resulting fluorescence of Thioflavin T was recorded every 5 min/cycle within 200 cycles using PHERAstar plate-reader. The different measures were normalized in % of fluorescence, 100% being defined as the maximum value reached in the positive Tau control, in each experiment.

Transmission Electron Microscopy

The same samples from the aggregation assays were recovered and a 10 μ l sample of each Tau:VHH ratio 1:1 condition was loaded on a formvar/carbon-coated grid (for 5 min and rinsed twice with water). After drying, the grids were stained with 1% uranyl acetate for 1 min. Tau fibrils were observed under a transmission electron microscope (EM 902 Zeiss).

Aggregation seeding assays in HEK293 reporter cell-line

Stable HEK293 Tau RD P301S FRET Biosensor cells (ATCC CRL-3275) were plated at a density of 100k cells/well in 24-well plates. For confocal analysis, cells were plated on poly-D-lysine and laminin coated slides at a density of 100k cells/well in 24-well plates. At 60% confluency, cells were first transfected with the various pmCherry-N1 plasmid constructs allowing expression of the mCherry-VHHs. Transfection complexes were obtained by mixing 500 ng of plasmid diluted in 40 μ l of opti-MEM medium, which include 18,5 μ L (46.25% v/v)

of opti-MEM medium + 1,5 μ L (3.75% v/v) Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Resulting liposomes were incubated at room temperature for 20 min before addition to the cells. Cells were incubated for 24 hours with the liposomes and 1 mL/well of high glucose DMEM medium (ATCC) with Fetal Bovine Serum 1% (Life technologies). The transfection efficiency was estimated to reach about 46%, for all mCherry-VHHs plasmids (Supplementary Fig. 9). Eight μ M of recombinant MTBD seeds were prepared *in vitro*, in the presence of 8 μ M heparin, as described (Holmes et al. 2014). Cells were then treated with MTBD seeds (10nM/well) in the presence of transfection reagents forming liposomes as here above described.

Confocal analysis

Cells were first washed twice with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min and next washed 3 times with 50 mM NH_4Cl in PBS. Glass slides were mounted with DAKO mounting medium (Agilent). Fluorescence imaging acquisitions were performed using an inverted confocal microscope (LSM 710, Zeiss, Jena, Germany) with a 40-times oil-immersion lens (NA 1.3 with an optical resolution of 176 nm). CFP, YFP and FRET, and mCherry fluorescence were imaged using UV, Argon 458/514 nm, DPSS 561 nm and Helium/ Neon 633 nm lasers, respectively. A focal plane was collected for each specimen. Images were processed with ZEN software.

FRET Flow Cytometry

Cells were recovered with trypsin 0,05% and fixed in 2% paraformaldehyde for 10 min, then suspended in PBS. Flow cytometry was performed on an ARIA SORP BD (Biosciences). To measure CFP emission fluorescence and FRET, cells were excited with a 405 nm laser. The fluorescence was captured with either a 466/40 or a 529/30 nm filter, respectively. To measure YFP fluorescence, a 488 nm laser was used for excitation and emission fluorescence was captured with a 529/30 nm filter. mCherry cells were excited with a 561 nm laser and fluorescence was captured with a 610/20 nm filter. To selectively detect and quantify FRET,

gating was used as described (Banning et al. 2010; Holmes et al. 2014). 3 independent experiments were done in triplicate or quadruplicate, with at least 10,000 cells per replicate analyzed.

Statistical analysis

Data are presented as the means (\pm s.e.m) for *in vitro* aggregation assays and aggregation seeding assays in HEK293 reporter cells. Experiments were performed at least in triplicate and obtained from three independent experiments. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney U-Test (GraphPad prism software) to determine the p-value. The differences were considered significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, or *** $P < 0.001$.

References

- Asuni, Ayodeji A., Allal Boutajangout, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2007. "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (34): 9115–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>.
- Banning, Carina, Jörg Votteler, Dirk Hoffmann, Herwig Koppensteiner, Martin Warmer, Rudolph Reimer, Frank Kirchhoff, Ulrich Schubert, Joachim Hauber, and Michael Schindler. 2010. "A Flow Cytometry-Based FRET Assay to Identify and Analyse Protein-Protein Interactions in Living Cells." *PLoS One* 5 (2): e9344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009344>.
- Bartel P.L, and Sternglanz R. 1993. "Cellular Interactions in Development: A Practical Approach." In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, edited by Hartley D.A, illustrated, 153–79. Practical Approach Series 131.
- Bergen, M. von, P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2000. "Assembly of Tau Protein into Alzheimer Paired Helical Filaments Depends on a Local Sequence Motif ((306)VQIVYK(311)) Forming Beta Structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10): 5129–34.
- Boutajangout, Allal, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2010. "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (49): 16559–66. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010>.
- Cadwell, R. C., and G. F. Joyce. 1992. "Randomization of Genes by PCR Mutagenesis." *PCR Methods and Applications* 2 (1): 28–33.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. "Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain." *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- Cohen, Todd J., Jing L. Guo, David E. Hurtado, Linda K. Kwong, Ian P. Mills, John Q. Trojanowski, and Virginia M. Y. Lee. 2011. "The Acetylation of Tau Inhibits Its Function and Promotes Pathological Tau Aggregation." *Nature Communications* 2: 252. <https://doi.org/10.1038/ncomms1255>.
- Congdon, Erin E., and Einar M. Sigurdsson. 2018. "Tau-Targeting Therapies for Alzheimer Disease." *Nature Reviews. Neurology*, June. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>.
- Courade, Jean-Philippe, Rachel Angers, Georges Mairet-Coello, Nathalie Pacico, Kerry Tyson, Daniel Lightwood, Rebecca Munro, et al. 2018. "Epitope Determines Efficacy of Therapeutic Anti-Tau Antibodies in a Functional Assay with Human Alzheimer Tau." *Acta Neuropathologica*, September. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1911-2>.
- Cummings, Jeffrey, Garam Lee, Travis Mortsdorf, Aaron Ritter, and Kate Zhong. 2017. "Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2017." *Alzheimer's & Dementia : Translational Research & Clinical Interventions* 3 (3): 367–84. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.05.002>.
- Dai, Chun-Ling, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, and Khalid Iqbal. 2017. "Tau Passive Immunization Inhibits Not Only Tau but Also A β Pathology." *Alzheimer's Research & Therapy* 9 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0227-5>.
- Danis, Clément, Clément Despres, Luiza M. Bessa, Idir Malki, Hamida Merzougui, Isabelle Huvent, Haoling Qi, et al. 2016. "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of Multiple Phosphorylations of Intrinsically Disordered Proteins." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 118 (27). <https://doi.org/10.3791/55001>.

- Derisbourg, Maxime, Coline Leghay, Giovanni Chiappetta, Francisco-Jose Fernandez-Gomez, Cyril Laurent, Dominique Demeyer, Sébastien Carrier, et al. 2015. "Role of the Tau N-Terminal Region in Microtubule Stabilization Revealed by New Endogenous Truncated Forms." *Scientific Reports* 5 (May): 9659. <https://doi.org/10.1038/srep09659>.
- Despres, Clément, Cillian Byrne, Haoling Qi, François-Xavier Cantrelle, Isabelle Huvent, Béatrice Chambraud, Etienne-Emile Baulieu, et al. 2017. "Identification of the Tau Phosphorylation Pattern That Drives Its Aggregation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, August. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708448114>.
- Evans, Lewis D., Thomas Wassmer, Graham Fraser, James Smith, Michael Perkinson, Andrew Billinton, and Frederick J. Livesey. 2018. "Extracellular Monomeric and Aggregated Tau Efficiently Enter Human Neurons through Overlapping but Distinct Pathways." *Cell Reports* 22 (13): 3612–24. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.021>.
- Fitzpatrick, Anthony W. P., Benjamin Falcon, Shaoda He, Alexey G. Murzin, Garib Murshudov, Holly J. Garringer, R. Anthony Crowther, Bernardino Ghetti, Michel Goedert, and Sjors H. W. Scheres. 2017. "Cryo-EM Structures of Tau Filaments from Alzheimer's Disease." *Nature*, July. <https://doi.org/10.1038/nature23002>.
- Fromont-Racine, M., J. C. Rain, and P. Legrain. 1997. "Toward a Functional Analysis of the Yeast Genome through Exhaustive Two-Hybrid Screens." *Nature Genetics* 16 (3): 277–82. <https://doi.org/10.1038/ng0797-277>.
- Frost, Bess, Rachel L. Jacks, and Marc I. Diamond. 2009. "Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12845–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
- Ghetti, B., A. L. Oblak, B. F. Boeve, K. A. Johnson, B. C. Dickerson, and M. Goedert. 2015. "Invited Review: Frontotemporal Dementia Caused by Microtubule-Associated Protein Tau Gene (MAPT) Mutations: A Chameleon for Neuropathology and Neuroimaging." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 41 (1): 24–46. <https://doi.org/10.1111/nan.12213>.
- Goedert, Michel, and Maria Grazia Spillantini. 2006. "A Century of Alzheimer's Disease." *Science (New York, N.Y.)* 314 (5800): 777–81. <https://doi.org/10.1126/science.1132814>.
- Guillozet-Bongaarts, Angela L., Kelly E. Glajch, Emilie G. Libson, Michael E. Cahill, Eileen Bigio, Robert W. Berry, and Lester I. Binder. 2007. "Phosphorylation and Cleavage of Tau in Non-AD Tauopathies." *Acta Neuropathologica* 113 (5): 513–20. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0209-6>.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman, and R. Hamers. 1993. "Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains." *Nature* 363 (6428): 446–48. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Herce, Henry D., Dominik Schumacher, Anselm F. L. Schneider, Anne K. Ludwig, Florian A. Mann, Marion Fillies, Marc-André Kasper, et al. 2017. "Cell-Permeable Nanobodies for Targeted Immunolabelling and Antigen Manipulation in Living Cells." *Nature Chemistry* 9 (8): 762–71. <https://doi.org/10.1038/nchem.2811>.
- Holmes, Brandon B., Jennifer L. Furman, Thomas E. Mahan, Tritia R. Yamasaki, Hilda Mirbaha, William C. Eades, Larisa Belaygorod, Nigel J. Cairns, David M. Holtzman, and Marc I. Diamond. 2014. "Proteopathic Tau Seeding Predicts Tauopathy in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (41): E4376–4385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411649111>.
- Hoover, Brian R., Miranda N. Reed, Jianjun Su, Rachel D. Penrod, Linda A. Kotilinek, Marianne K. Grant, Rose Pitstick, et al. 2010. "Tau Mislocalization to Dendritic Spines

- Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration." *Neuron* 68 (6): 1067–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>.
- Karlsson, Robert, Phinikoula S. Katsamba, Helena Nordin, Ewa Pol, and David G. Myszka. 2006. "Analyzing a Kinetic Titration Series Using Affinity Biosensors." *Analytical Biochemistry* 349 (1): 136–47. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.034>.
- Katsinelos, Taxiarchis, Marcel Zeitler, Eleni Dimou, Andromachi Karakatsani, Hans-Michael Müller, Eliana Nachman, Julia P. Steringer, Carmen Ruiz de Almodovar, Walter Nickel, and Thomas R. Jahn. 2018. "Unconventional Secretion Mediates the Trans-Cellular Spreading of Tau." *Cell Reports* 23 (7): 2039–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>.
- Li, Tengfei, Jean-Pierre Bourgeois, Susanna Celli, Fabienne Glacial, Anne-Marie Le Sourd, Salah Mecheri, Babette Weksler, et al. 2016. "Cell-Penetrating Anti-GFAP VHH and Corresponding Fluorescent Fusion Protein VHH-GFP Spontaneously Cross the Blood-Brain Barrier and Specifically Recognize Astrocytes: Application to Brain Imaging." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (10): 3969–79. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201384>.
- Li, Tengfei, Matthias Vandesquille, Fani Koukouli, Clémence Duffeffant, Ihsen Youssef, Pascal Lenormand, Christelle Ganneau, et al. 2016. "Camelid Single-Domain Antibodies: A Versatile Tool for in Vivo Imaging of Extracellular and Intracellular Brain Targets." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 243 (December): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019>.
- Lippens, Guy, Alain Sillen, Caroline Smet, Jean-Michel Wieruszeski, Arnaud Leroy, Luc Buée, and Isabelle Landrieu. 2006. "Studying the Natively Unfolded Neuronal Tau Protein by Solution NMR Spectroscopy." *Protein and Peptide Letters* 13 (3): 235–46.
- Luna-Vargas, Mark P. A., Evangelos Christodoulou, Andrea Alfieri, Willem J. van Dijk, Magda Stadnik, Richard G. Hibbert, Danny D. Sahtoe, et al. 2011. "Enabling High-Throughput Ligation-Independent Cloning and Protein Expression for the Family of Ubiquitin Specific Proteases." *Journal of Structural Biology* 175 (2): 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.017>.
- Matz, Julie, and Patrick Chames. 2012. "Phage Display and Selections on Purified Antigens." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 907: 213–24. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_11.
- Mirbaha, Hilda, Dailu Chen, Olga A. Morazova, Kiersten M. Ruff, Apurwa M. Sharma, Xiaohua Liu, Mohammad Goodarzi, et al. 2018. "Inert and Seed-Competent Tau Monomers Suggest Structural Origins of Aggregation." *ELife* 7 (July). <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>.
- Mok, Sue-Ann, Carlo Condello, Rebecca Freilich, Anne Gillies, Taylor Arhar, Javier Oroz, Harindranath Kadavath, et al. 2018. "Mapping Interactions with the Chaperone Network Reveals Factors That Protect against Tau Aggregation." *Nature Structural & Molecular Biology* 25 (5): 384–93. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0057-1>.
- Moutel, Sandrine, Nicolas Bery, Virginie Bernard, Laura Keller, Emilie Lemesre, Ario de Marco, Laetitia Ligat, et al. 2016. "NaLi-H1: A Universal Synthetic Library of Humanized Nanobodies Providing Highly Functional Antibodies and Intrabodies." *ELife* 5 (July). <https://doi.org/10.7554/eLife.16228>.
- Mukrasch, Marco D., Stefan Bibow, Jegannath Korukottu, Sadasivam Jeganathan, Jacek Biernat, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. "Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution." *PLoS Biology* 7 (2): e34. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>.
- Nelson, Peter T., Irina Alafuzoff, Eileen H. Bigio, Constantin Bouras, Heiko Braak, Nigel J. Cairns, Rudolph J. Castellani, et al. 2012. "Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature." *Journal*

- of Neuropathology and Experimental Neurology* 71 (5): 362–81.
<https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.
- Nobuhara, Chloe K., Sarah L. DeVos, Caitlin Commins, Susanne Wegmann, Benjamin D. Moore, Allyson D. Roe, Isabel Costantino, et al. 2017. “Tau Antibody-Targeting Pathological Species Block Neuronal Uptake and Interneuron Propagation of Tau in Vitro.” *The American Journal of Pathology*, April.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.022>.
- Novak, M, J Kabat, and C M Wischik. 1993. “Molecular Characterization of the Minimal Protease Resistant Tau Unit of the Alzheimer’s Disease Paired Helical Filament.” *The EMBO Journal* 12 (1): 365–70.
- Pain, Coralie, Janice Dumont, and Mireille Dumoulin. 2015. “Camelid Single-Domain Antibody Fragments: Uses and Prospects to Investigate Protein Misfolding and Aggregation, and to Treat Diseases Associated with These Phenomena.” *Biochimie* 111 (April): 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.012>.
- Sanders, David W., Sarah K. Kaufman, Sarah L. DeVos, Apurwa M. Sharma, Hilda Mirbaha, Aimin Li, Scarlett J. Barker, et al. 2014. “Distinct Tau Prion Strains Propagate in Cells and Mice and Define Different Tauopathies.” *Neuron* 82 (6): 1271–88.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>.
- Sawaya, Michael R., Shilpa Sambashivan, Rebecca Nelson, Magdalena I. Ivanova, Stuart A. Sievers, Marcin I. Apostol, Michael J. Thompson, et al. 2007. “Atomic Structures of Amyloid Cross-Beta Spines Reveal Varied Steric Zippers.” *Nature* 447 (7143): 453–57.
<https://doi.org/10.1038/nature05695>.
- Schwarz, Adam J., Peng Yu, Bradley B. Miller, Sergey Shcherbinin, James Dickson, Michael Navitsky, Abhinav D. Joshi, Michael D. Devous, and Mark S. Mintun. 2016. “Regional Profiles of the Candidate Tau PET Ligand 18F-AV-1451 Recapitulate Key Features of Braak Histopathological Stages.” *Brain: A Journal of Neurology* 139 (Pt 5): 1539–50.
<https://doi.org/10.1093/brain/aww023>.
- Seidler, P. M., D. R. Boyer, J. A. Rodriguez, M. R. Sawaya, D. Cascio, K. Murray, T. Gonen, and D. S. Eisenberg. 2018. “Structure-Based Inhibitors of Tau Aggregation.” *Nature Chemistry* 10 (2): 170–76. <https://doi.org/10.1038/nchem.2889>.
- Spencer, Brian, Sven Brüsweiler, Marco Sealey-Cardona, Edward Rockenstein, Anthony Adame, Jazmin Florio, Michael Mante, et al. 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>.
- Sultan, Audrey, Fabrice Nessler, Marie Violet, Séverine Bégard, Anne Loyens, Smail Talahari, Zeyni Mansuroglu, et al. 2011. “Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection.” *The Journal of Biological Chemistry* 286 (6): 4566–75.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>.
- Tanaka, Tomoyuki, and Terence H. Rabbitts. 2003. “Intrabodies Based on Intracellular Capture Frameworks That Bind the RAS Protein with High Affinity and Impair Oncogenic Transformation.” *The EMBO Journal* 22 (5): 1025–35.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg106>.
- Troquier, Laetitia, Raphaëlle Caillierez, Sylvie Burnouf, Francisco J. Fernandez-Gomez, Marie-Eve Grosjean, Nadege Zommer, Nicolas Sergeant, Susanna Schraen-Maschke, David Blum, and Luc Buee. 2012. “Targeting Phospho-Ser422 by Active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 Mouse Model: A Suitable Therapeutic Approach.” *Current Alzheimer Research* 9 (4): 397–405.
- Vielemeyer, Ole, Clément Nizak, Ana Joaquina Jimenez, Arnaud Echard, Bruno Goud, Jacques Camonis, Jean-Christophe Rain, and Franck Perez. 2010. “Characterization of Single

- Chain Antibody Targets through Yeast Two Hybrid." *BMC Biotechnology* 10 (August): 59. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-59>.
- Vojtek, A. B., and S. M. Hollenberg. 1995. "Ras-Raf Interaction: Two-Hybrid Analysis." *Methods in Enzymology* 255: 331–42.
- Wang, Yipeng, Varun Balaji, Senthilvelrajan Kaniyappan, Lars Krüger, Stephan Irsen, Katharina Tepper, RamReddy Chandupatla, et al. 2017. "The Release and Trans-Synaptic Transmission of Tau via Exosomes." *Molecular Neurodegeneration* 12 (1): 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. "A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858–62.
- Wilcock, G. K., and M. M. Esiri. 1982. "Plaques, Tangles and Dementia. A Quantitative Study." *Journal of the Neurological Sciences* 56 (2–3): 343–56.
- Zhang, Y., C. Chang, D. J. Gehling, A. Hemmati-Brivanlou, and R. Derynck. 2001. "Regulation of Smad Degradation and Activity by Smurf2, an E3 Ubiquitin Ligase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (3): 974–79. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.3.974>.

Competing interest

VHH phage-display screen, E4-1 VHH optimization and epitope site mapping of VHH Z70 were all contracted to Hybrigenic services.

Acknowledgements

We thank Dr Z. Lens and Dr M. Aumercier for their help on the T200 biacore measurements from the Biomolecular interactions analysis platform (PAIB). We also thank M. Tardivel and A. Bongiovanni for their help on the Zeiss confocal microscope, from the Photonic Microscopy Core BioImaging Center (BiCeL) and N. Jouy for the cytometry experiments, from the Flow Core Facility (BiCel).

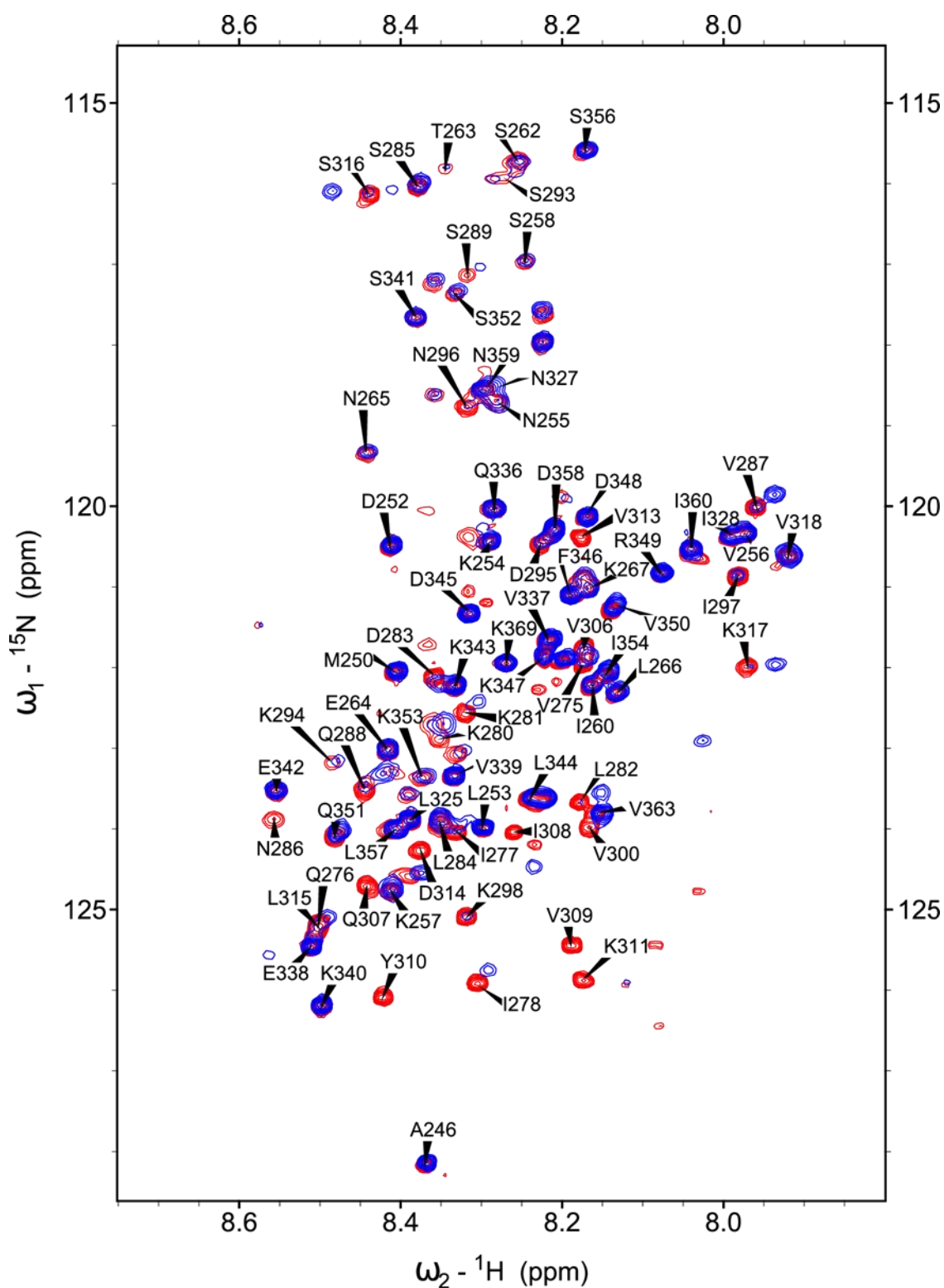
Author contribution statement

CD, ED, MA, RC, XH, MC, LB and IL performed and supervised the experiments; F-XC performed and supervised the NMR experiments; AA and J-CR performed the screen, the optimization of the VHHs and the epitope mapping; AL performed the EM experiments; SB prepared cells for confocal analysis; HM prepared recombinant proteins; CD, ED and IL wrote the manuscript; J-CR, LB and IL conceived the study; J-C, MC, XH and LB revised the manuscript.

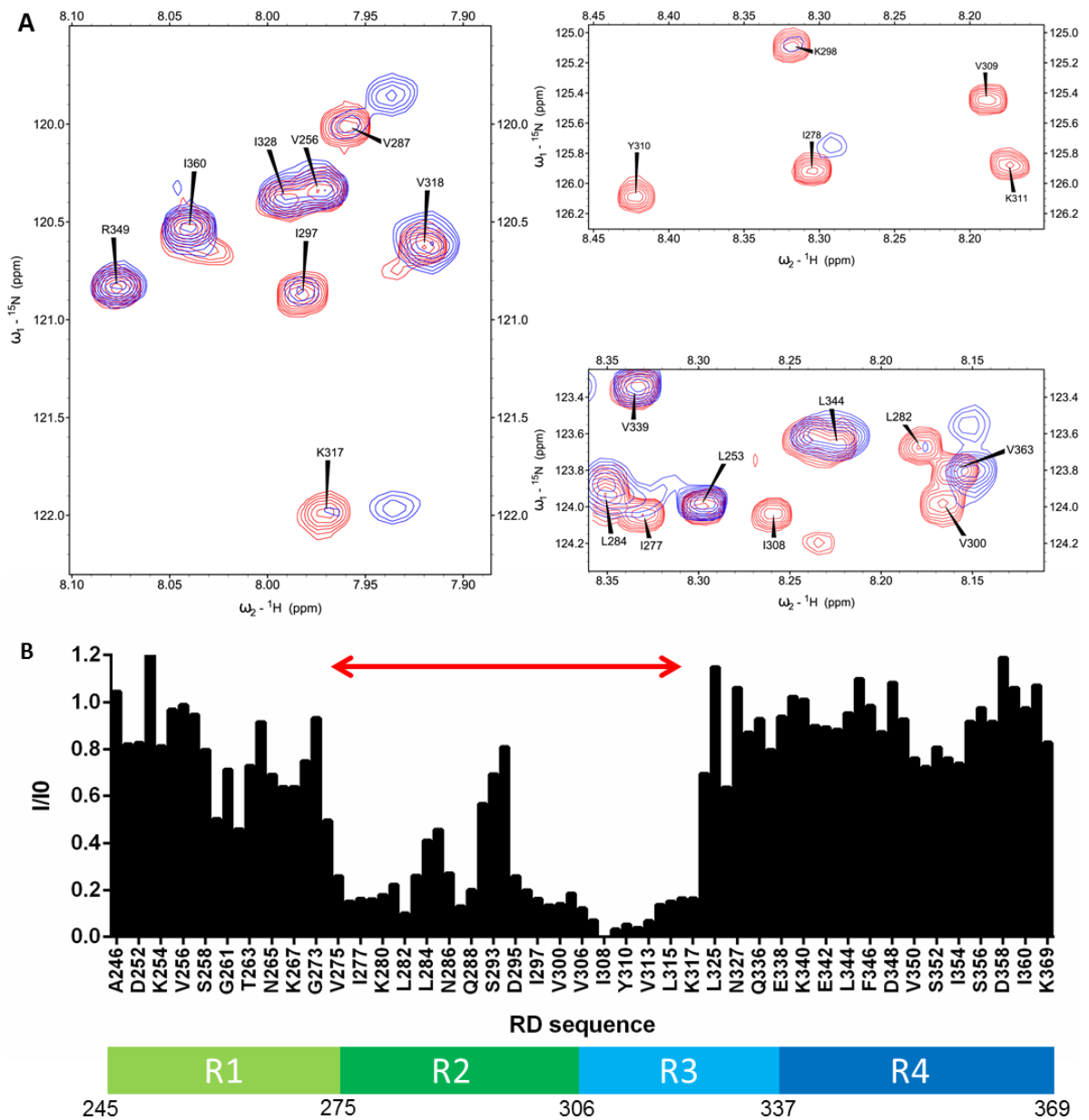
Funding

The NMR facilities were funded by the Nord Region Council, CNRS, Institut Pasteur de Lille, European Union (FEDER), French Research Ministry and Univ. Lille. We acknowledge support from TGE RMN THC (FR-3050, France) and FRABio (Univ. Lille, CNRS, FR 3688). This study was supported by the LabEx (Laboratory of Excellence) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease ANR-11-LABX-01), by EU project AgedBrainSYSBIO (Grant Agreement N° 305299) by I-site ULNE (project TUNABLE) and by ANR (project ToNIC). Our laboratories are also supported by LiCEND (Lille Centre of Excellence in Neurodegenerative Disorders), Inserm, Métropole Européenne de Lille, Univ. Lille and FEDER.

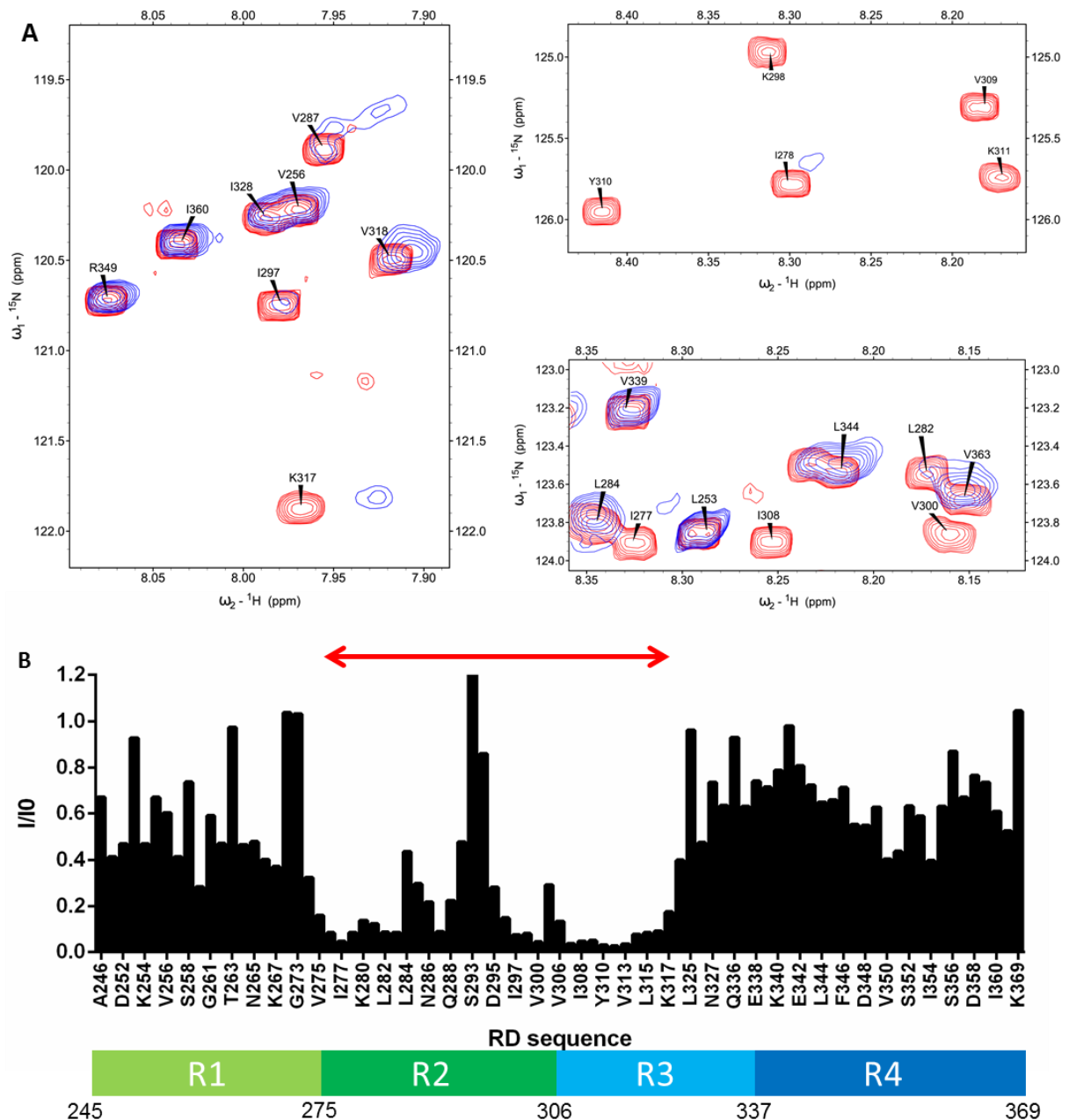
Supplementary Figures



Supplementary Figure 1 : identification of E4-1 epitope using Tau MTBD. overlay of ${}^1\text{H}$, ${}^{15}\text{N}$, HSQC two-dimensional spectra of ${}^{15}\text{N}$ -labelled and assigned Tau MTBD (red) with ${}^{15}\text{N}$ -labelled Tau MTBD mixed with non-labelled E4-1 spectra (in blue).



Supplementary Figure 2 : identification of E4-1 VHH epitope using Tau MTBD. **A** : overlays of ^1H , ^{15}N , HSQC two-dimensional spectra enlargements of ^{15}N -labelled Tau MTBD (red) with ^{15}N -labelled Tau MTBD mixed with non-labelled E4-1 spectra (in blue). **B** : Intensities ratio I/I_0 of corresponding resonances in the two-dimensional spectra of Tau MTBD with equimolar quantity of VHH (I) or free in solution (I_0) for residues along the Tau MTBD sequence. Overlapping resonances are not considered (x-axis is not scaled). A red double-arrow indicates the region containing the corresponding major broadened resonances, which was mapped to the R2-R3 repeats in the MTBD.

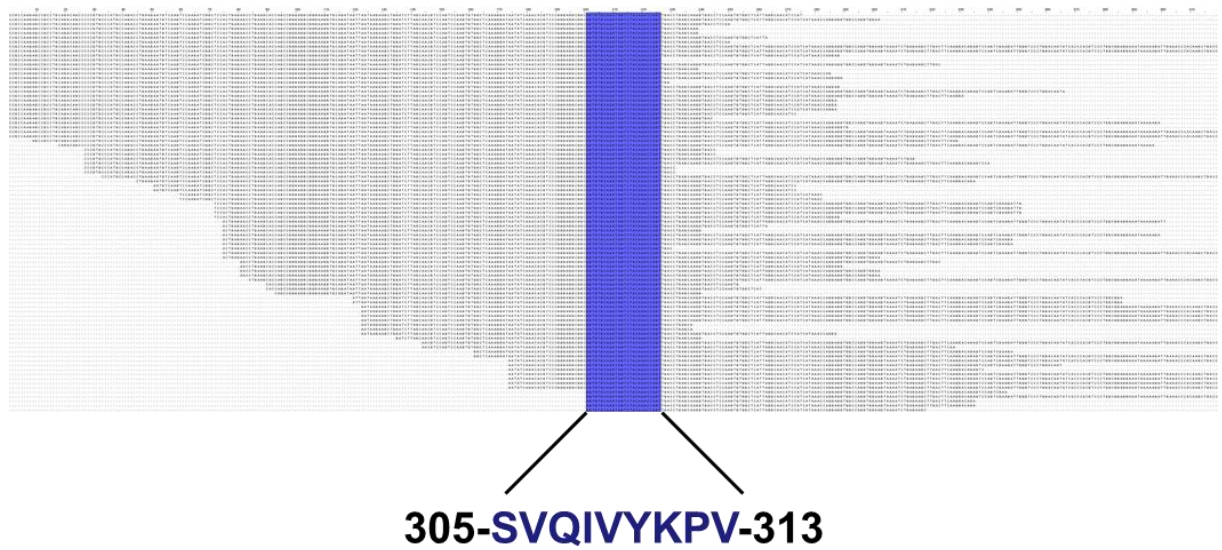


Supplementary Figure 3 : identification of Z70 VHH epitope using Tau MTBD. **A** : overlays of ^1H , ^{15}N , HSQC two-dimensional spectra enlargements of 1 ^{15}N -labelled Tau MTBD (red) with ^{15}N -labelled Tau MTBD mixed with non-labelled Z70 spectra (in blue). **B** : Intensities ratio I/I_0 of corresponding resonances in the two-dimensional spectra of Tau MTBD with equimolar quantity of VHH (I) or free in solution (I_0) for residues along the Tau MTBD sequence. Overlapping resonances are not considered (x-axis is not scaled). A red double-arrow indicates the region containing the corresponding major broadened resonances, which was mapped to the R2-R3 repeats in the MTBD.

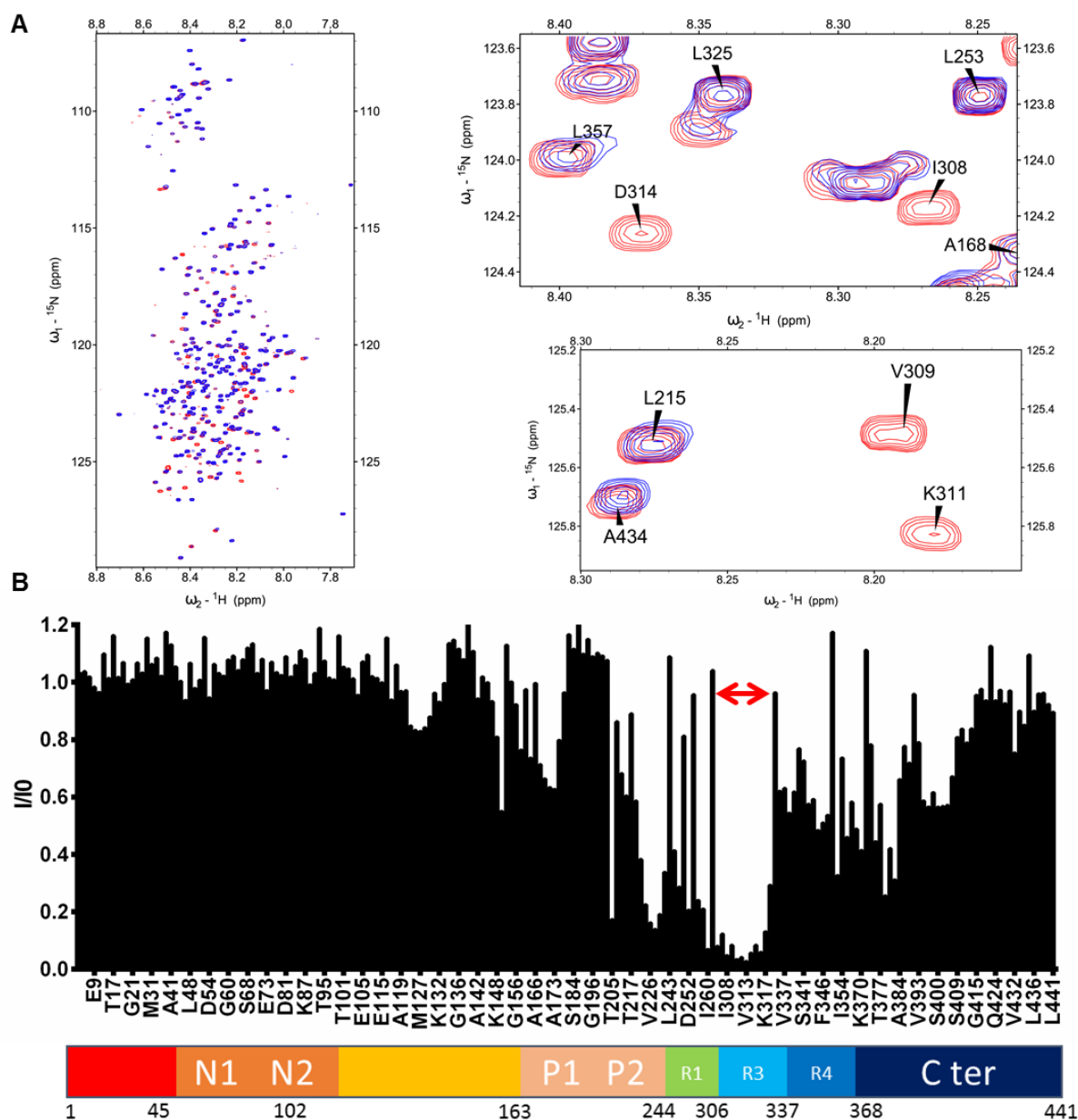
VHH	k_{on} (1/M.s)	k_{off} (1/s)	Kd (nM)
E4-1	4982	0,0017	345
Z70	18100	0,0026	147

Tau peptide	sequence	k_{on} (1/M.s)	k_{off} (1/s)	Kd (nM)
Tau[273-318]	²⁷³ GKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIV YKPVDSLKV ₃₁₈	91914	0,0077	85

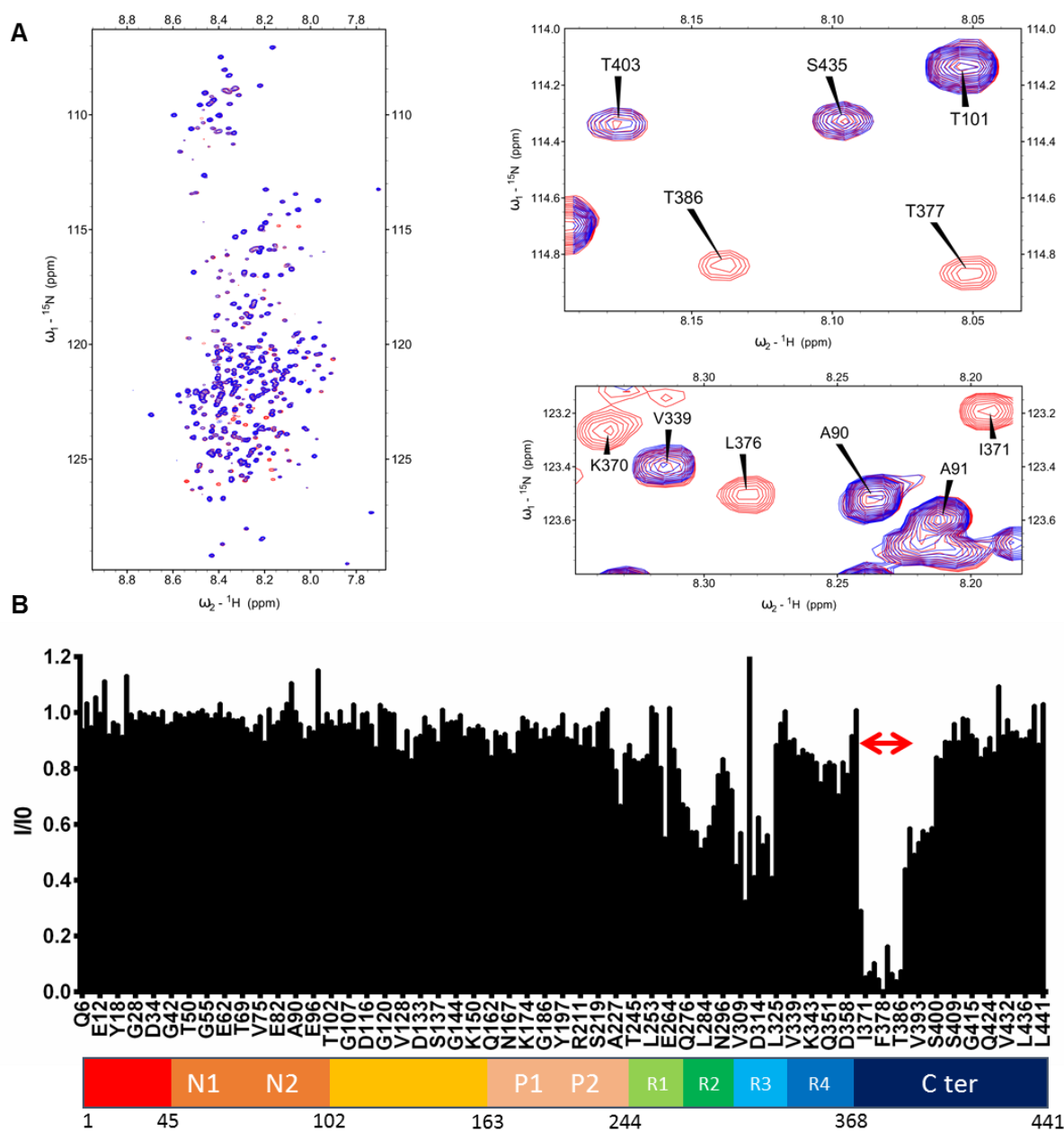
Supplementary Figure 4 : Optimized mutant VHH Z70 has a better affinity for Tau than VHH E4-1. Tables corresponding to k_{on} , k_{off} and resulting Kd obtained from SPR experiments. Sequence of the Tau peptide used for the interaction with immobilized VHH Z70 on the chip is also included.



Supplementary Figure 5 : Identification of the minimal epitope recognized by VHH Z70 using Tau fragment library and yeast two hybrid. Sequence alignment of the Tau fragments corresponding to the 90 positive binders to VHH Z70. The minimal common sequence is highlighted.



Supplementary Figure 6 : identification of Z70 epitope using 2D HSQC NMR experiment. **A** : overlays of ${}^1\text{H}$, ${}^{15}\text{N}$, HSQC two-dimensional spectra enlargements of ${}^{15}\text{N}$ -labelled Tau 2N3R, free (red) or mixed with non-labelled VHH Z70 (in blue). Spectra enlargements show broadened resonances corresponding to residues implicated in the interaction **B** : Intensities ratio I/I_0 of corresponding resonances in the two-dimensional spectra of Tau 2N3R with equimolar quantity of VHH (I) or free in solution (I_0) for residues along the Tau 2N3R sequence. Overlapping resonances are not considered (x-axis is not scaled). Tau 2N3R lacks the R2 repeats. Tau 2N3R residue numbering corresponds to the Tau 2N4R sequence, for clarity. A red double-arrow indicates the region containing the corresponding major broadened resonances, which was mapped mostly on the PHF6 motif, showing PHF6 is sufficient for Z70-Tau binding.



Supplementary Figure 7 : identification of F8-2 epitope using 2D HSQC NMR experiment. **A** : Superimposition of two-dimensional ^1H , ^{15}N HSQC spectra of ^{15}N -Tau (in red) with ^{15}N -Tau mixed with non-labelled VHH F8-2 (overlaid in blue) ($n=1$). Spectra enlargements show broadened resonances corresponding to residues implicated in the interaction. **B** : Normalized intensities I/I_0 of corresponding resonances in the two-dimensional spectra of Tau with equimolar quantity of VHH F8-2 (I) or free in solution (I_0) for residues along the Tau sequence. Overlapping resonances are not considered (x-axis is not scaled). A red double-arrow indicates the region containing the corresponding major broadened resonances, which was mapped to the C-terminus domain on Tau.

3390

5pTCTGCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATAACAATCAACTCCAAGCTAGAAC
CATGGCGGAAGTGCAGCTGCAGGCTC

3880

3pTCTTCTTTTTTGGAGGCTCGGGAATTAATTCCGCTTTATCCATCTTTGCGGCGGC
CGCGCTACTCACAGTTACCTG

6690

5pCAGGGCAATAAAGTCGAACT

6972

5pGACCTACAGGAAAGAGTTACTC

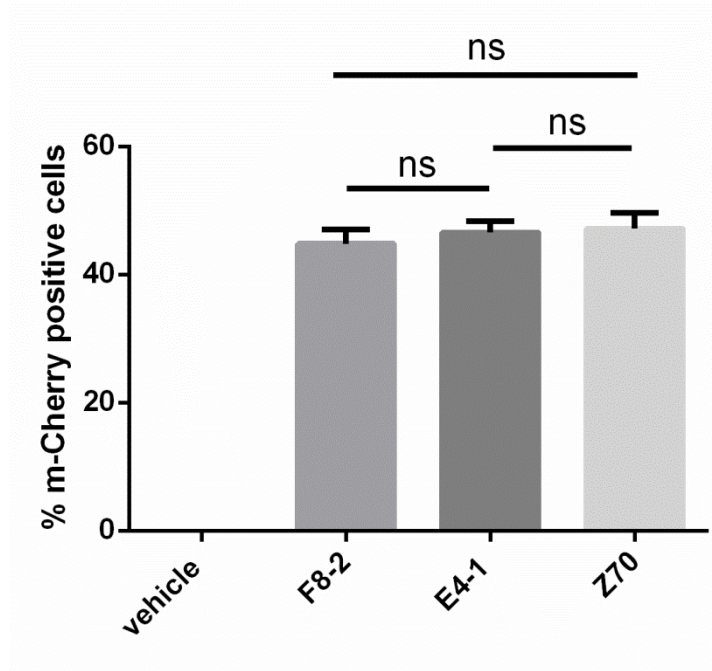
10829

5pCTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCCTAGAACT
AGACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCC

10830

5pCCGGGCCTCTAGACACTAGCTACTCGAGGGGCCCCAGTGGCCCTATCTATGCG
GCCGCTCAGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC

Supplementary Figure 8 Oligonucleotide sequences (Material and Methods)



Supplementary Figure 9 : Percentage of m-Cherry positive cells in the cellular aggregation assay. Transfection efficiency of the different m-Cherry-VHH plasmids are equivalent: 44,8 (± 2,2%) for F8-2, 46,6 (± 1,8%) for E4-1 and 47,2 % (± 2,5%) for Z70.

C. Vers une nouvelle optimisation du VHH Z70

Comme nous l'avons vu précédemment, le VHH Z70 présente des propriétés extrêmement intéressantes. Il peut être exprimé de manière intracellulaire et il a démontré une importante activité inhibitrice de l'agrégation de Tau. Toutefois, les paramètres d'affinité, avec un KD estimé entre 80 et 145 nM du Z70, peuvent être améliorés.

Dans cette optique, nous avons réalisé une nouvelle optimisation du Z70. Toujours en collaboration avec Hybrigenics services et de la même manière qu'avec le VHH F8-2, une banque de mutants a été générée par mutagenèse aléatoire et criblée par double hybride. Le crible double hybride a permis de sélectionner 7 mutants positifs. Un mutant additionnel ne faisant pas partie du criblage mais qui correspond à la combinaison des mutations des mutants 1 et 3 a été généré sous le nom de Mut20. Ces 8 mutants ont par la suite été criblés en SPR afin de déterminer les paramètres d'affinité de chacun de ces mutants (Figure 45, Table 2). L'optimisation réalisée a été un succès : Les KDs qui ont été déterminés pour les différents mutants sont plus faibles que celui déterminé pour le Z70. Le Mut1 a un KD proche de 23 nM ce qui signifie que l'affinité a été améliorée d'un facteur six. Cela représente une très bonne affinité pour un VHH dirigé contre une protéine désordonnée.

Des premières expériences d'agrégation de Tau *in vitro* et en présence des différents mutants ont été réalisées. Les mutants Mut1 et Mut12 semblent montrer une meilleure activité que le VHH Z70. Les expériences seront répétées par la suite pour confirmer cet effet et les meilleurs candidats seront testés dans un second temps dans le modèle de « seeding » afin de confirmer ces observations.

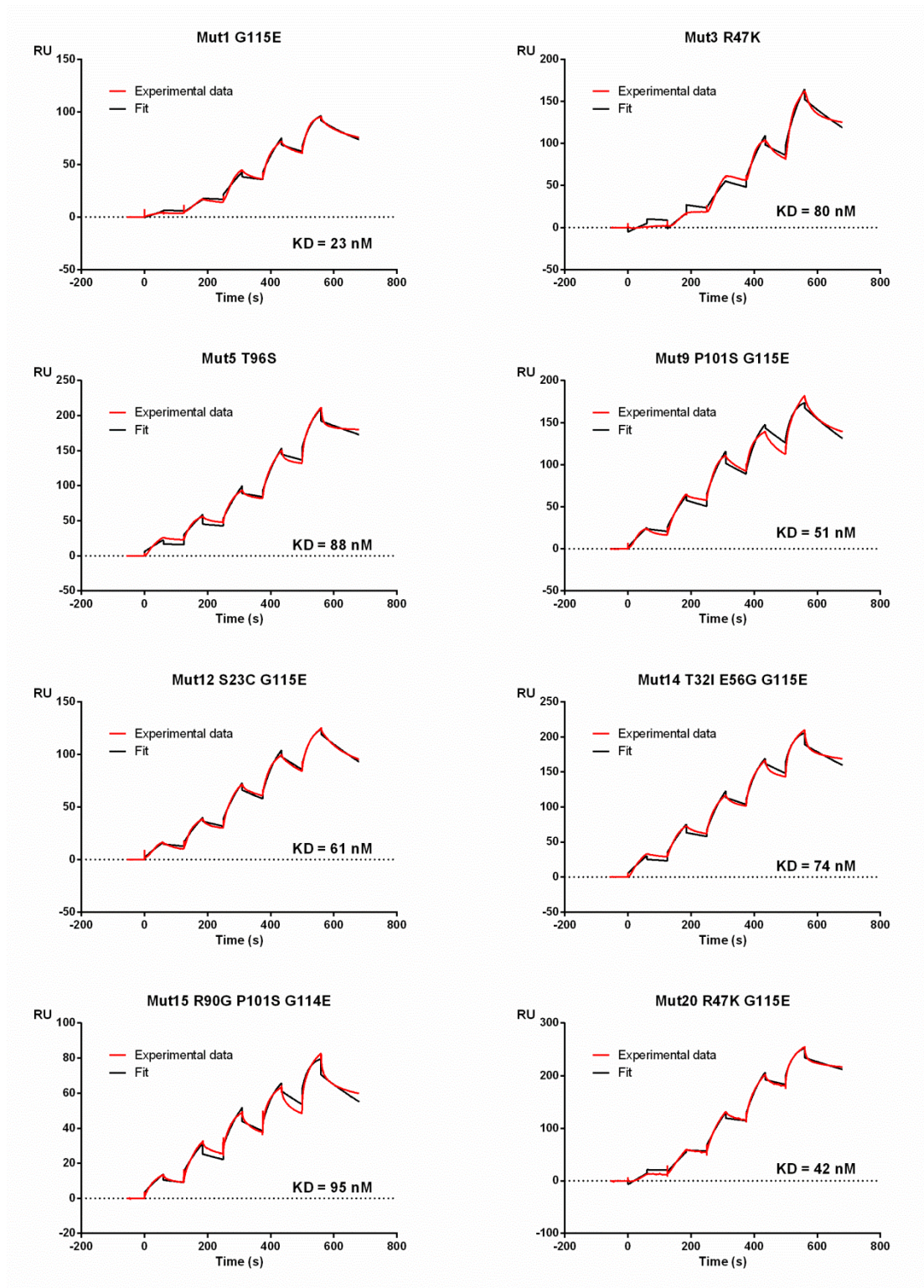


Figure 45 : Détermination des KDs par SPR. Représentation des sensorgrammes obtenus pour les VHHs Z70 ainsi que pour les 8 mutants. Les KDs ont été obtenus en utilisant la méthode SCK. Le nom de chaque mutant et les mutations associées sont annotés au-dessus de chaque sensorgramme.

VHH	Mutations	k_{on} (1/M.s)	k_{off} (1/s)	Kd (nM)	SE (nM)
Z70	/	18100	0.0026	147	1.1
Mut1	G115E	106744	0.0024	23	0.7
Mut3	R47K	26042	0.0021	81	2.2
Mut5	T96S	10918	0.0009	81	1.7
Mut9	P101S G115E	40110	0.0020	51	0.8
Mut12	S23C G115E	33865	0.0021	61	0.8
Mut14	T32I E56G G115E	18799	0.0014	74	1.0
Mut15	R90G P101S G114E	21264	0.0020	95	1.5
Mut20	R47K G115E	21285	0.0009	42	1.0

Table 2 : Constantes d'association (k_{on}), de dissociation (k_{off}) et constantes d'équilibre (KD) obtenues par SPR pour les différents complexes Z70 mutants/Tau.

III. Etude préliminaire du VHH E4-1 et de sa version optimisée Z70 dans le modèle de souris THY-Tau30

Quand une molécule présente une activité potentiellement thérapeutique, il est essentiel de caractériser son effet dans un modèle animal. Ceci a pour but de déterminer l'efficacité et la toxicité de la molécule et ouvre la voie vers de premières études précliniques. C'est pourquoi au début de l'année 2017, nous avons démarré deux études préliminaires sur le modèle de souris transgénique THY-Tau30 hétérozygotes ainsi que sur des souris dites littermates (souris sauvages provenant de l'accouplement des souris THY-Tau30). Sous le contrôle du promoteur Thy1.2, les souris THY-Tau30 surexpriment le gène codant pour la protéine Tau humaine 1N4R mutée sur deux sites (G272V et P301S)(Leroy et al., 2007). Nous avons réalisé des injections intra-crânielles (IC) du VHH E4-1 dans les souris THY-Tau30 dans le but de caractériser le profil de distribution de E4-1 au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral des souris. Nous avons également réalisé des injections intrapéritonéales (IP) afin de déterminer si E4-1 est capable de traverser la BHE. Ces expériences ont pour but de définir la meilleure stratégie expérimentale pour évaluer le potentiel thérapeutique du VHH Z70 et potentiellement de ses mutants optimisés dans ces modèles.

A. E4-1 est internalisé par les neurones du cortex et est retrouvé de manière diffuse dans l'hippocampe

14 μ g de VHHs E4-1 c-Myc produits de manière recombinante et dilués dans du PBS ou mélangés préalablement avec du lysat provenant du cerveau d'un patient atteint

de la MA ont été préparés. Ces deux mélanges ont été injectés dans les souris THY-Tau30 en IC de façon bilatérale au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe (Figure 46).

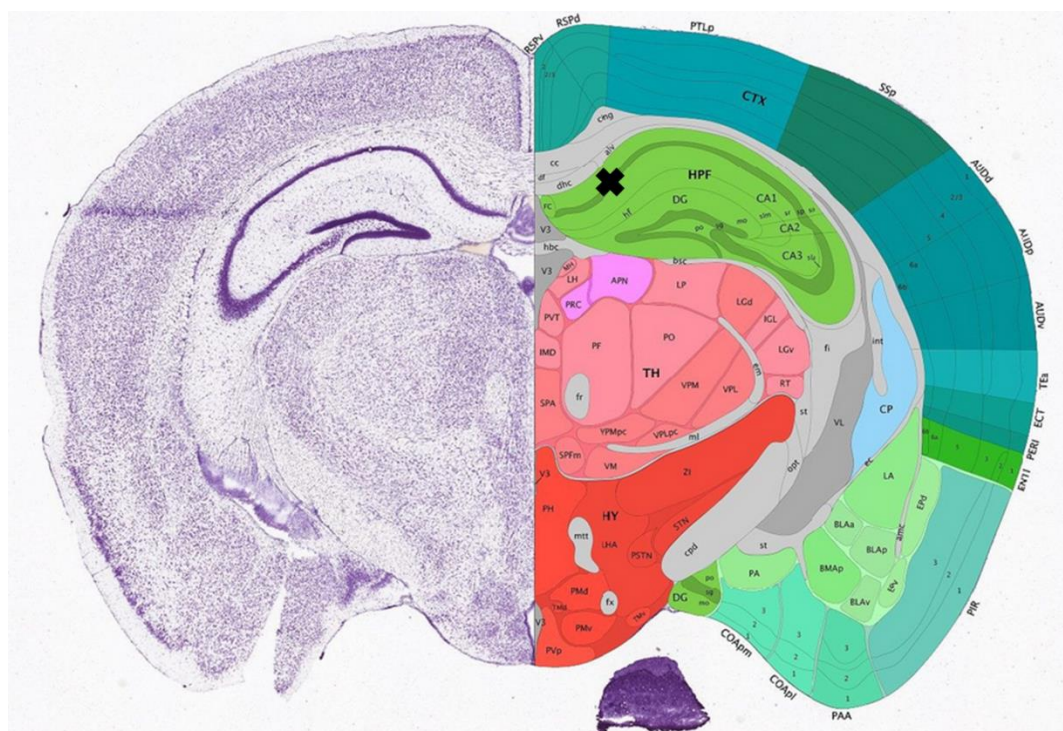


Figure 46 : Schéma détaillant les différentes parties du cerveau de la souris en coupe coronale ; la croix représente le site d'injection qui se situe au niveau de la couche neuronale CA1 de l'hippocampe.

L'injection du lysat Alzheimer est réalisée au laboratoire pour accélérer le développement de la pathologie dans ce modèle de souris et de pouvoir réaliser des études sur des temps plus courts (1 à 2 mois). Dans notre expérience, l'injection du lysat a pour but de vérifier si le VHH peut être associé au lysat dans les différentes régions du cerveau. Les souris ont ensuite été sacrifiées 1 heure, 6 heures et 18 heures après l'injection.

Les coupes de cerveau sont montées sur lames superfrosts et incubées par la suite avec des anticorps anti c-Myc de souris et anticorps anti Tau C-ter de lapin (qui reconnaît un épitope situé au niveau du domaine C-terminale de la protéine). Les lames sont incubées avec un mix d'anticorps anti-souris Alexa 488 nm (fluorescence verte) et anti-lapin Alexa 568 nm (fluorescence rouge). Un marquage de l'ADN nucléaire est effectué avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les lames sont ensuite analysées par microscopie confocale de fluorescence.

Une heure après injection, E4-1 est localisé principalement dans l'hippocampe et le cortex (Figure 47 a-b). Le profil de distribution du VHH E4-1 est différent selon la région du cerveau. E4-1 est localisé dans le milieu extracellulaire dans l'hippocampe (Figure 47 a). D'un autre côté, dans le cortex pariétal postérieur, E4-1 est localisé dans le milieu extracellulaire mais également dans les corps cellulaires des neurones (Figure 47b). L'internalisation ne semble pas être dépendante de la présence du lysat puisque E4-1 est également internalisé dans les neurones du cortex pariétal postérieur des souris injectées avec du PBS (Figure 47d).

Les mêmes expériences ont été réalisées sur des souris sauvages avec des résultats similaires : le VHH E4-1 est principalement internalisé dans les neurones du cortex. Ces données suggèrent que l'internalisation de E4-1 ne serait pas dépendante de la pathologie Tau ou d'une interaction avec la protéine Tau elle-même, mais plutôt liée à une spécificité neuronale. Les mêmes profils de distribution du VHH E4-1 ont été obtenus 6 heures après injection. Nous avons observé que 18 heures après injection, la majorité du signal provenant du c-Myc est atténué dans l'hippocampe et le cortex. Il a déjà été décrit que la clairance est beaucoup plus rapide pour les VHHs que pour les anticorps conventionnels. Le VHH E4-1 a probablement une demi-vie courte dans le cerveau et est déjà majoritairement éliminé après 18 heures. Nous avons également observé une dégradation partielle des étiquettes c-Myc suite à la production recombinante des VHHs. Il n'est donc pas impossible d'envisager que la disparition du signal soit également dû à une protéolyse des étiquettes c-Myc, ce qui entraînerait une perte du signal.

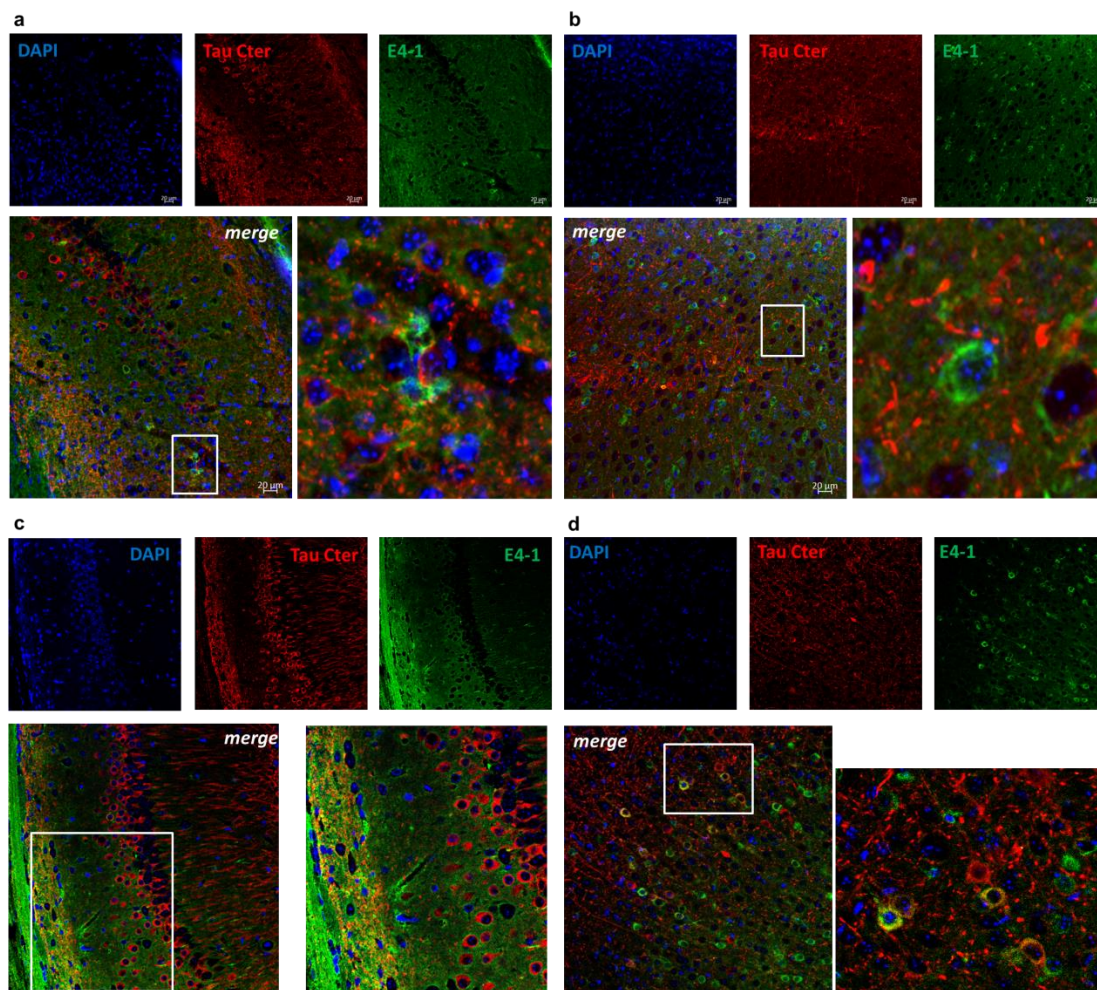


Figure 47 : Injection en IC du VHH E4-1 incubé préalablement avec du lysat provenant du cerveau d'un patient atteint de la MA (a-b) ou avec du PBS (c-d) dans les souris THY-Tau30 (grossissement 20X). Visualisation des noyaux cellulaires (en bleu), du VHH E4-1 c-Myc (en vert) et de la protéine Tau (en rouge) par microscopie confocale. a-c : Localisation du VHH E4-1 dans la CA1 de l'hippocampe, 1h après injection. b-d : Localisation du VHH E4-1 dans le cortex, 1h après injection.

Ces premiers résultats sont encourageants : le VHH E4-1 diffuse de manière importante au sein du cerveau. Cela a déjà été décrit à de nombreuses reprises car la diffusion d'une molécule dans le cerveau est dépendante de sa taille. Les VHHs sont beaucoup plus petits que les anticorps conventionnels et diffusent donc de façon plus importante. De manière plus intrigante, E4-1 est uniquement internalisé par les neurones du cortex. Existerait-il des récepteurs spécifiques permettant l'internalisation du VHH par ces neurones et quels en seraient les mécanismes ? Cela reste à déterminer. La clairance du VHH semble toutefois être rapide même après son injection directe dans le cerveau. Cela peut également représenter un avantage pour éviter des problèmes de toxicité liés à son accumulation.

B. Le VHH E4-1 ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique

Nous avons également voulu déterminer si le VHH E4-1 était capable de traverser la BHE. Pour cela, E4-1 a été injecté en (IP) à trois concentrations différentes (0,375 mg/mL, 0,750 mg/mL, et 1,5 mg/mL) dans les souris littermates. Deux injections ont été réalisées. La deuxième injection a été effectuée 2 jours (J3) après la première injection (J1). Les souris ont été sacrifiées le jour suivant (J4). Nous avons ensuite analysé différentes régions du cerveau par western-blot en utilisant en contrôle positif le VHH E4-1 c-Myc produit de façon recombinante (Figure 48).

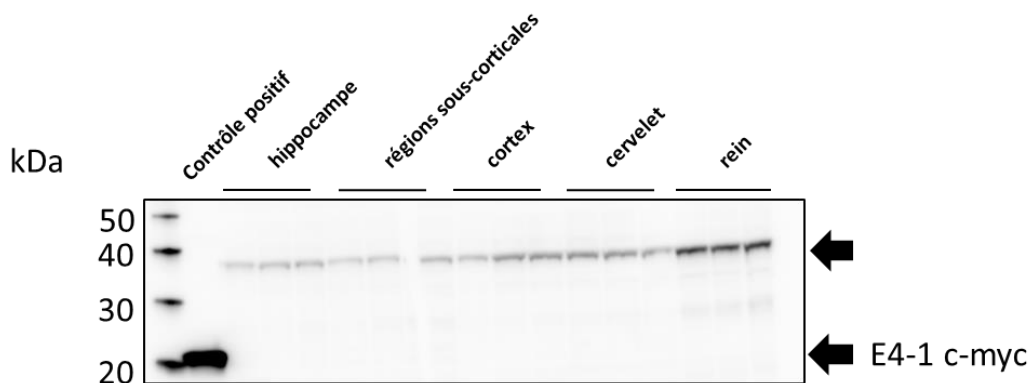


Figure 48 : E4-1 n'est pas retrouvé dans le cerveau des souris après injection en IP. Western blot des broyats correspondants aux différentes régions du cerveau ainsi que du rein. Le contrôle positif correspond au VHH E4-1 c-Myc produit de manière recombinante (bande à 20 kDa). Une bande est également observée à 38 kDa et ne correspond pas à la taille de E4-1 c-myc.

Le VHH E4-1 n'est pas retrouvé dans les différentes régions du cerveau étudiées ce qui suggère que E4-1 n'est pas capable de traverser la BHE. Le rein a également été analysé pour tenter de localiser E4-1. On pourrait en effet imaginer une accumulation de E4-1 dans le rein suite au processus de clairance du VHH. Néanmoins, le VHH n'est pas non plus retrouvé dans le rein. On note la présence d'une bande additionnelle à une masse moléculaire d'environ 38 kDa. L'anticorps primaire utilisé est un anticorps dirigé contre un épitope localisé dans la région C-terminale de la protéine c-Myc. Il serait donc possible d'envisager une reconnaissance spécifique de la protéine dans différents tissus. Toutefois, cette protéine ne semble pas correspondre à la protéine c-Myc qui possède une masse

moléculaire de 48 kDa, Toutefois, on peut envisager que la protéine c-Myc puisse être clivée par un processus naturelle et ainsi observée à cette taille de 38 kDa. Cette bande pourrait également provenir d'une interaction non spécifique de l'anticorps anti c-Myc avec une autre protéine.

C. Injections de vecteurs lentiviraux codants pour le VHH Z70 dans le modèle de souris THY-Tau30

Suite à ces deux premières études, les premières conclusions démontrent que le VHH E4-1 ne traverse pas la BHE et qu'il semble rapidement éliminé dans le cerveau. Il est donc difficile d'envisager une étude par injection du VHH en IP ou en intraveineuse pour tester son potentiel thérapeutique.

Toutefois, la version optimisée du VHH E4-1, Z70, peut être exprimée et fonctionner de manière intracellulaire, possède un plus faible KD et présente une meilleure activité inhibitrice de l'agrégation de Tau. Nous avons donc réalisé une construction lentivirale codant pour le VHH-Z70 dans le but de réaliser des injections en IC de ces vecteurs lentiviraux dans le cerveau des souris THY-Tau30. Les vecteurs lentiviraux vont pouvoir infecter les cellules neuronales et permettre l'expression du VHH à l'intérieur de ces cellules. Par la suite, l'idée sera d'évaluer l'effet du VHH, sur le développement et le nombre d'agrégats de Tau au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe en utilisant des anticorps dirigés contre des épitopes phosphorylés de Tau.

Ces expériences sont en cours de réalisation et les premiers résultats sont attendus d'ici la fin de l'année.

Conclusions et perspectives

Au cours de ces trois années de thèse, nous avons développé et caractérisé plus de 27 VHHs dirigés contre la protéine Tau. Nous avons déterminé la majorité de leurs épitopes par RMN. Nous avons également vu qu'il était possible d'affiner cette caractérisation épitopique en utilisant des fragments de Tau pour réaliser les expériences, ou encore en utilisant une autre méthode que la RMN quand cela était nécessaire. La RMN s'est également révélée être un outil efficace pour déterminer l'épitope de VHHs dirigés contre la protéine Tau phosphorylée puisque nous avons efficacement caractérisé le site d'interaction du VHH E5-1 qui correspond aux résidus phosphorylés pS46-pT50.

Ces résultats montrent la force de la RMN, qui peut être utilisée comme outil de criblage pour déterminer les épitopes de VHHs dirigés contre Tau et ainsi les sélectionner en fonction de leur site de reconnaissance. Par ailleurs, nous avons également eu l'occasion de caractériser les épitopes d'anticorps monoclonaux conventionnels dirigés contre Tau, produits par le laboratoire « Alzheimer et Tauopathies ». Ces anticorps sont utilisés au laboratoire pour réaliser des western-blot, des ELISA ainsi que des immunomarquages.

Les travaux réalisés ont permis de déterminer les paramètres d'affinité pour chaque interaction Tau/VHH en utilisant la SPR. Nous avons, sur la même et unique puce où Tau est immobilisée, criblé et déterminé le KD pour la majorité des interactions. Globalement, les KDs obtenus sont proches de la centaine de nM et du même ordre de grandeur que ceux décrits dans la littérature pour un VHH dirigé contre la protéine intrinsèquement non structurée α -synucléine (De Genst et al., 2010). Nous avons montré qu'il était possible d'optimiser les VHHs de manière efficace, pour permettre leur expression et leur activité intracellulaire et/ou pour améliorer leurs paramètres d'affinité. En collaboration avec Hybrigenics service, nous avons ainsi sélectionné par mutagenèse aléatoire et sélection double hybride, différents mutants exprimés de manière intracellulaire ayant une meilleure affinité. Des KDs atteignant des valeurs inférieures à la centaine de nM ont été obtenus. Par exemple, le VHH Mut1 dérivé du Z70 qui est dérivé lui-même du E4-1 possède un Kd de 23 nM, ce qui représente l'une des meilleures affinités obtenues et décrites aujourd'hui à notre connaissance, pour un VHH dirigé contre un segment désordonné d'une protéine.

Nous avons montré que certains VHHs tel que E4-1, inhibe l'agrégation de Tau *in vitro*. L'hypothèse de travail est que E4-1, en se liant au motif PHF6, séquestre la forme monomérique de Tau et empêche les interactions intermoléculaires du PHF6 nécessaire à son agrégation. De plus, E4-1 pourrait également agir par phénomène de compétition avec l'héparine au niveau de ce motif, empêchant ainsi le déclenchement de son agrégation. La combinaison de ces deux phénomènes pourrait expliquer l'efficacité du VHH E4-1 dans cette expérience. De manière intéressante, le mutant Z70, présente un meilleur KD que E4-1 ainsi qu'une meilleure activité inhibitrice de l'agrégation de Tau *in vitro*. Contrairement au VHH E4-1, Z70 est exprimé de manière fonctionnelle au sein des cellules. Le VHH Z70 est capable d'inhiber la formation d'agrégats de Tau dans le modèle cellulaire de « seeding ». Z70 interagit avec la protéine Tau endogène au niveau de son PHF6 empêchant ainsi son recrutement par les fibres. Enfin, de récentes expériences ont montré que les mutants Mut1 et Mut12 inhibent plus fortement l'agrégation de Tau *in vitro* que Z70. Ces mutants seront prochainement testés dans le modèle cellulaire de « seeding ». Ces résultats prouvent à quel point l'optimisation d'un VHH est essentielle pour évaluer et améliorer son potentiel thérapeutique.

Enfin, nous avons réalisé des études préliminaires avec le VHH E4-1 dans des modèles de souris développant une tauopathie. Les premiers résultats obtenus suggèrent que le VHH E4-1 diffuse de manière importante au niveau du cerveau de ces souris. Toutefois, il est éliminé moins d'un jour après l'injection et est internalisé uniquement dans les neurones du cortex. Le VHH E4-1 n'est pas observé dans le cerveau des souris suite à des injections en IP suggérant que E4-1 n'est pas capable de traverser la BHE. Des injections de vecteurs lentiviraux codant pour le VHHZ70 réalisées dans le même modèle de souris ont donc été conduites afin d'étudier sa capacité à bloquer l'agrégation de Tau *in vivo*, et potentiellement sa propagation.

Le nombre de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et les maladies associées augmente d'années en années et pourrait atteindre les 130 millions d'ici 2050 (Prince et al., 2016). Il n'existe actuellement aucun traitement pour soigner ces patients. Bien que des essais cliniques soient en cours (Congdon and Sigurdsson, 2018), la complexité des tauopathies associée à la faible compréhension que nous avons de leur mécanismes pathologiques sous-jacents a provoqué un désintérêt des entreprises pharmaceutiques pour continuer à développer des programmes de recherche concentrés sur ces maladies.

Les mécanismes pathologiques associés à Tau ne sont à ce jour pas tous clairement élucidés, même si de nombreux progrès ont été faits. Néanmoins, plusieurs études ont montré qu'il était possible de réduire la formation des NFTs et d'améliorer les fonctions cognitives dans de nombreux modèles de souris et rats développant une tauopathie (Asuni et al., 2007; Dai et al., 2018, 2017; Subramanian et al., 2016; Troquier et al., 2012). La majorité des études cliniques ciblant Tau sont par ailleurs des immunothérapies (Congdon and Sigurdsson, 2018). Toutes ces données suggèrent que l'utilisation d'anticorps spécifiques contre Tau peut représenter une stratégie efficace pour cibler Tau et ralentir les déficits cognitifs chez les patients.

Cependant, la question reste de savoir quels épitopes de Tau faudrait-il cibler et dans quel compartiment cellulaire ? Faudrait-il cibler des formes phosphorylées, non phosphorylées, acétylées, oligomériques ou fibrillaires ? Au vue de la probable propagation de type prion de Tau, devrait-on cibler certaines espèces extracellulaires de Tau pour empêcher leur internalisation ? La réduction des déficits cognitifs passe-t-elle par l'élimination des espèces intracellulaires potentiellement toxiques pour les neurones ?

Certains travaux aujourd'hui nous permettent de concevoir de nouvelles hypothèses à ce sujet. Des études cellulaires ont notamment montré que des anticorps dirigés contre des épitopes localisés dans le domaine N-ter de Tau pouvaient bloquer son transfert entre les neurones (Nobuhara et al., 2017). Au vue du probable caractère de type prion de Tau, empêcher sa propagation en ciblant les espèces extracellulaires pourrait représenter une stratégie thérapeutique efficace. Toutefois, d'autres études ont montré que cibler le domaine N-ter de Tau pourrait se montrer insuffisant. L'entreprise UCB Biopharma a développé un anticorps appelé UCB0107,

dont l'épitope reconnu est $_{235}\text{SPSSAKSRLQTA}_{246}$ localisé à la fin du PRD qui vient d'entrer en phase clinique (Figure 24). Cet anticorps inhibe l'agrégation de Tau *in vitro* mais également dans un modèle cellulaire de « seeding » (Courade et al., 2018). Ceci n'est pas le cas pour d'autres anticorps dirigés contre des épitopes localisés dans le domaine N-ter comme l'anticorps BMS-6986168 développé par Bristol Myers et dirigé contre l'épitope $_{9}\text{EVMEDHAGTY}_{18}$, également en essai clinique de phase II (Figure 24). Très récemment, des expériences réalisées dans le modèle de souris THY-Tau30 ont montré que des injections de l'anticorps UCB0107 en IP, suite à une injection en IC de lysat de cerveau de patient Alzheimer, permettait la réduction significative du nombre de NFTs au niveau de l'hippocampe en bloquant la propagation des espèces pathologiques, empêchant ainsi le phénomène de « seeding ». De manière intéressante, l'anticorps BMS-6986168 ne permet pas de réduire le nombre de NFTs au niveau de l'hippocampe. Ces résultats suggèrent donc que cibler le phénomène de « seeding » de Tau pourrait également être essentiel pour réduire la pathologie Tau chez les patients. Le choix de l'épitope déterminerait le mécanisme ciblé et pourrait donc être crucial pour l'obtention d'un traitement efficace (Courade et al., 2018) (Albert et al, *in revision*).

Nous avons également montré que certains VHHs pouvaient se révéler plus efficaces pour inhiber l'agrégation de Tau en fonction de leur épitope. Le VHH E4-1, à travers sa version optimisée Z70 et de ses mutants, reconnaît spécifiquement le peptide $_{305}\text{SVQIVYKPV}_{313}$ qui inclut le motif PHF6 (Figure 49). Ce motif a été décrit comme un des principaux facteurs impliqués dans son agrégation (von Bergen et al., 2000) et est retrouvé dans le cœur des fibres de Tau provenant de différentes tauopathies (Falcon et al., 2018; Fitzpatrick et al., 2017). Nous avons ainsi montré à travers le VHH Z70, que cibler un épitope localisé au niveau des cœurs de nucléation de Tau pouvait se révéler efficace pour inhiber son agrégation, à l'inverse des VHHs ciblant des épitopes au niveau du PRD, du sous-domaine R4 ou du domaine C-ter de Tau (Figure 49). Le VHH Z70 est également capable de bloquer le recrutement et l'agrégation de protéine Tau intracellulaire endogène dans un modèle cellulaire de « seeding » (Figure 49). Récemment, Mirbaha et ses collaborateurs ont proposé que les motifs PHFs d'espèces fibrillaires capables de « seeding » seraient exposés aux

solvants et accessibles, ce qui permettrait le recrutement et la conversion de la protéine Tau endogène via ces motifs dans le phénomène de « seeding » (Mirbaha et al., 2018). Il serait donc intéressant d'évaluer si le VHH Z70 peut également exercer son activité en bloquant directement les espèces fibrillaires extracellulaires. Nous pourrions envisager d'incuber au préalable les fibres avec différentes concentrations du VHH Z70, puis traiter les cellules du modèle de « seeding » avec les différents mélanges.

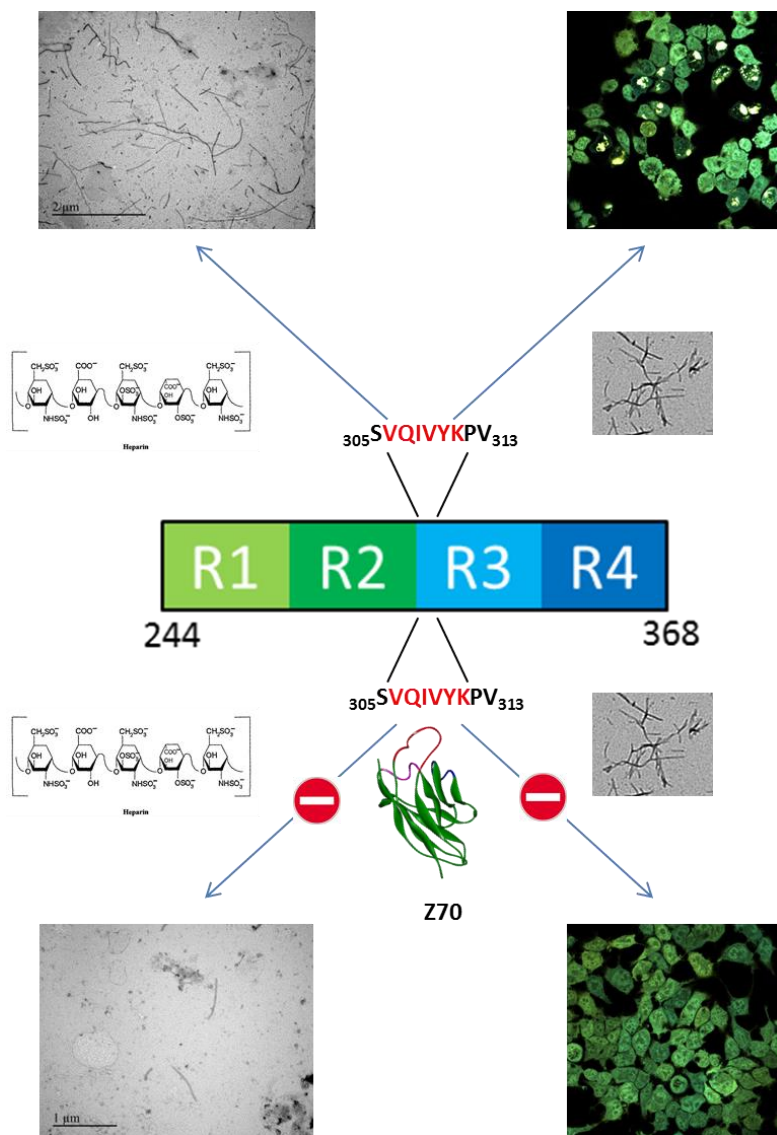


Figure 49 : Mécanisme d'action du VHH Z70 sur l'agrégation de Tau. Le VHH Z70 cible et séquestre le peptide PHF6 localisé dans la région répétée R3, inhibant l'agrégation de Tau induit par l'héparine (gauche) et le phénomène de « seeding » induit par les fibres de Tau (à droite).

A partir de ces résultats, nous en avons conclu que le VHH Z70 présentait un intérêt thérapeutique. C'est pourquoi nous venons de débiter des expériences avec ce VHH dans un modèle de souris développant une tauopathie qui vont nous permettre d'évaluer son effet sur la pathologie Tau dans un modèle *in vivo*. Le VHH est utilisé de deux manières dans cette expérience :

- la première a été de faire exprimer Z70 de manière intracellulaire dans les neurones de l'hippocampe (Figure 50 ①). Ces études ont été initiées et les premiers résultats sont attendus d'ici la fin de l'année.
- La deuxième sera d'évaluer l'effet du VHH Z70 dans le milieu extracellulaire. Pour cela, nous avons également prévu de réaliser des vecteurs lentiviraux codant pour le VHH fusionnée au domaine constant Fc de souris. Le VHH Z70 sera donc exprimé par les neurones puis sécrété sous forme d'anticorps (Figure 50 ②).

Pour évaluer l'effet thérapeutique du VHH Z70, des immunomarquages seront réalisés pour quantifier le nombre de NFTs au niveau de la couche CA1 de l'hippocampe de ces souris. Ces deux expériences vont également nous permettre d'étudier deux mécanismes d'action avec une activité du VHH en intracellulaire et extracellulaire. A travers ces résultats, nous espérons pouvoir évaluer la contribution des phénomènes de propagation, d'internalisation et de « seeding » exercée par Tau dans la pathologie.

Toutefois, si les résultats obtenus avec le VHH Z70 sont positifs, il sera nécessaire de reconsidérer la stratégie thérapeutique. Il est bien sur envisageable de considérer une thérapie génique, qui pourrait concerner les patients atteints de tauopathies à évolution rapide telle que la PSP (Magne and Courbon, 2010) (Figure 50 ①②). Toutefois, cela reste une stratégie thérapeutique lourde et difficile à mettre en place. Dans l'idéal, pour pouvoir proposer un traitement immunothérapeutique efficace, il est donc nécessaire d'avoir un anticorps capable de traverser la BHE et de pouvoir exercer par la suite son activité biologique. Pour cela, les VHHs sont de formidables outils car ils sont facilement modifiables pour pouvoir les adapter à nos besoins. Pour traverser la BHE, différentes études ont montré que les VHHs possédant un point isoélectrique (pI) basique sont les seuls capables de la traverser (Li et al., 2016a,

2016b). Or, lors de nos expériences préliminaires, nous avons observé que les constructions E4-1 c-Myc ne sont pas retrouvées dans le cerveau des souris injectés en IP. Les VHH E4-1 et E4-1 c-Myc possèdent un pI théorique de 4,8, avec ou sans les étiquettes c-Myc ce qui pourrait expliquer les résultats négatifs obtenus.

Afin d'augmenter la capacité d'un VHH à traverser la BHE, une première possibilité est de réaliser une construction du VHH fusionnée à un peptide pénétrant, également appelé « cell penetrating peptide » (CPP). Ces CPPs sont généralement composés d'une suite de résidus cationiques. Le peptide dérivé de la protéine trans-activatrice de la transcription (TAT) du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est le plus couramment utilisé mais il en existe d'autres tels que le peptide penetratin ou encore uniquement composé d'une chaîne de polyarginine (Guidotti et al., 2017). En réalisant une construction Z70-CPP, il serait ainsi possible d'obtenir un VHH potentiellement capable de traverser la BHE mais également de traverser les membranes cellulaires pour cibler Tau. Herce et ses collaborateurs ont travaillé sur le développement de VHH-CPPs pour étudier les mécanismes intracellulaires. Ils ont mis au point des CPPs cycliques qui permettent d'augmenter de manière significative le pourcentage de VHHs internalisés dans les cellules (Herce et al., 2017). De plus, ils ont également développé un système de CPP cyclique qui, une fois à l'intérieur du cytoplasme, est clivé par les conditions réductrices de celui-ci (Herce et al., 2017). Cette stratégie permettrait de développer un VHH Z70-CPP cyclique qui, une fois clivé dans le cytoplasme des neurones, pourrait cibler la protéine Tau (Figure 50 ③). Nous avons pour cela commencé une collaboration avec l'équipe du Pr. Christian Hackenberger située à Berlin pour mettre au point des VHHs Z70 fusionnées à différentes constructions de CPPs. Nous espérons pouvoir évaluer l'effet de ces nouveaux VHHs Z70 dans les modèles cellulaires et murins décrits auparavant.

Une deuxième possibilité pour obtenir un VHH capable de traverser la BHE serait de réaliser une construction bivalente comprenant le Z70 fusionné à un VHH sélectionné pour sa capacité à traverser la BHE, tel que le VHH FC5 décrit précédemment (Muruganandam et al., 2002). Une telle construction pourrait permettre, par l'action du FC5, de traverser la BHE, puis par l'action du Z70, de cibler la protéine Tau présente dans le milieu extracellulaire (Figure 50 ④).

Nous avons également vu précédemment que la majorité des VHHs développés par Ablynx les plus avancés en essai clinique étaient constitués de deux, voire trois VHHs fusionnés ensemble. Pour augmenter l'efficacité du Z70, l'idée serait de réaliser des constructions bivalentes voire trivalentes, et constituées des Mut1 ou Mut12, qui présentent une meilleure affinité et efficacité *in vitro* (Figure 50 ⑤).

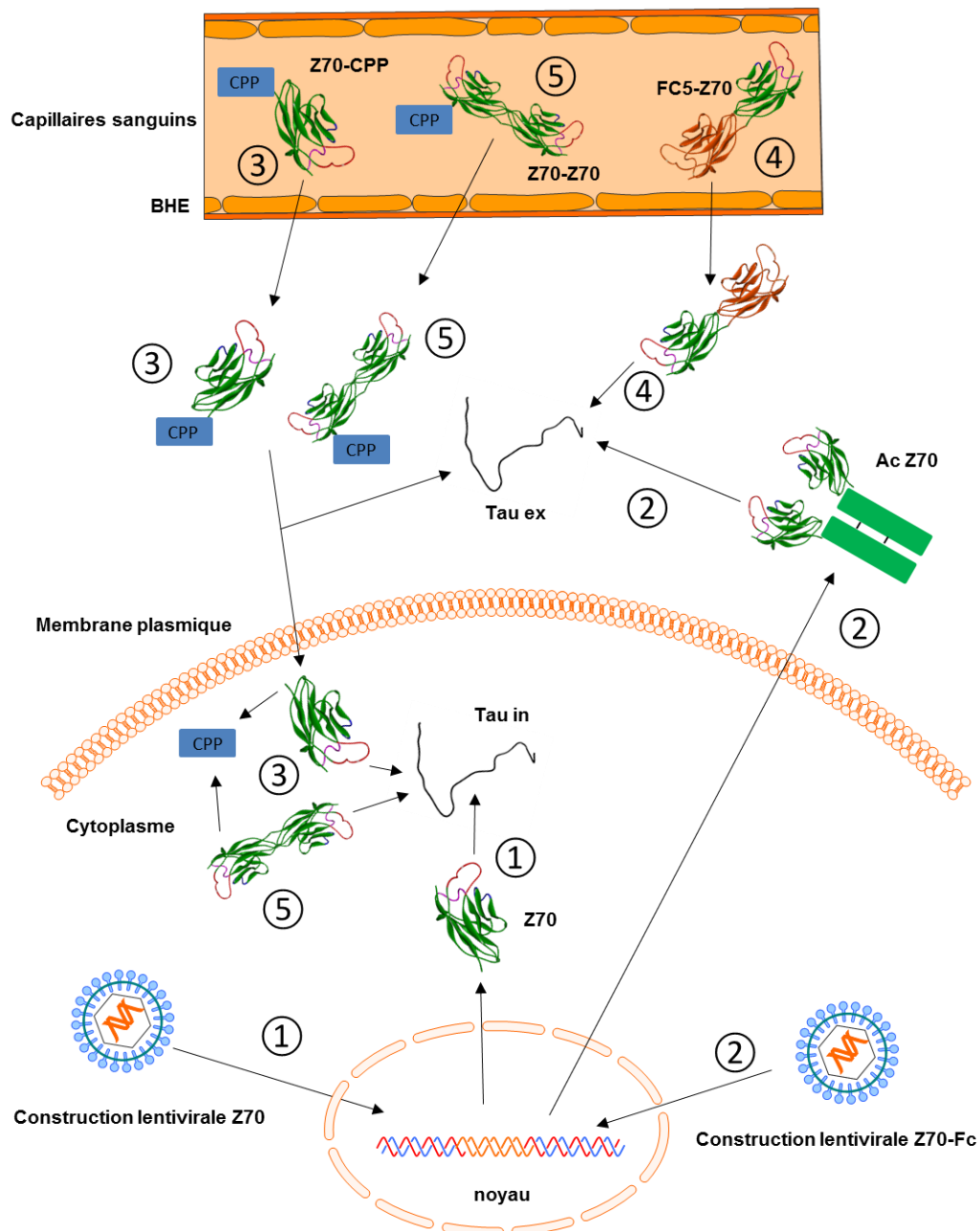


Figure 50 : Les différentes stratégies thérapeutiques envisagées avec le VHH Z70 ou l'un de ses mutants pour cibler la protéine Tau présente en extracellulaire (Tau ex) et/ou intracellulaire (Tau in). ①-② : thérapie génique par expression ① du VHH seul (Z70) ou ② du VHH fonctionnalisé en anticorps (Ac Z70). ③ : Fonctionnalisation du VHH avec l'ajout d'une étiquette CPP pour pouvoir traverser la BHE et le cytoplasme des neurones (Z70-CPP). ④ : Fonctionnalisation du VHH avec un autre VHH capable de traverser la BHE (Z70-FC5). ⑤ : Construction de formes bivalentes ou trivalentes du VHH pour améliorer son activité (Z70-Z70).

Au cours de ces trois années, nous avons ainsi développé et caractérisé de nombreux VHHs dirigés contre différentes formes de Tau. Certains de ces VHHs seront utilisés pour étudier les mécanismes physiopathologiques de Tau. D'autres, comme le VHH Z70 et ses mutants continueront d'être évalués d'un point de vue thérapeutique. Les avancements réalisés dans ce projet vont faire l'objet d'un dépôt de brevet et a récemment permis l'obtention d'un financement ANR. Ces travaux seront donc poursuivis dans les années à venir avec je l'espère, à la clé, le développement d'un VHH thérapeutique qui pourra être proposé comme traitement pour les patients atteints de la MA et des autres tauopathies.

Matériels et méthodes

Les protocoles concernant la majorité des expériences réalisées dans le cadre de la caractérisation des VHHs dirigés contre la forme recombinante et non modifiée de Tau (incluant la production des VHH, de Tau et de ses fragments, des expériences de RMN, de SPR, les agrégations *in vitro* et les expériences dans le modèle cellulaire de « seeding ») sont détaillés dans l'article « Inhibition of Tau aggregation by targeting its nucleation core with a *Camelid* heavy chain only antibody » (p132).

Les protocoles de production, purification, de phosphorylation de la protéine Tau *in vitro* ainsi que son étude par RMN a fait l'objet d'une publication présentée ci-dessous en annexe, intitulée « Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of Multiple Phosphorylations of Intrinsically Disordered Proteins » (p261).

Dans cette partie est donc uniquement détaillée les protocoles des expérimentations ne faisant pour le moment pas l'objet d'une publication.

A. Banque d'ADN plasmidique

Afin de caractériser les VHHs dirigés contre Tau, nous avons réalisé différentes constructions plasmidiques résumées dans le tableau ci-dessous :

Tau	VHH
pET-15b Tau2N4R/F245-368/F208-324	pHEN2 VHH-6His-3c-myc
pEM-15 GFP-Tau-1N4R	pmCherry-N1 mCherry-VHH

Les constructions plasmidiques pET-15b Tau2N4R, pET-15b F245-368, pET-15b F208-324 ont été utilisées pour produire les formes recombinantes marquées 15N ou non de la protéine Tau 2N4R et de ses fragments.

Les constructions plasmidiques pHEN2 VHH-6His-3c-Myc ont été utilisées pour produire les VHHs de manière recombinante. Le plasmide pHEN2 contient un peptide signal permettant l'adressage et le repliement des VHHs dans le périplasme des bactéries.

Les constructions plasmidiques pEM-15 GFP-Tau-1N4R pmCherry-N1 mCherry-VHH ont été utilisés dans des expériences en cellules N2A et HEK293 FRET (modèle de « seeding »). Le plasmide pEM15 contient un peptide signal permettant la relocalisation intracellulaire de la GFP au niveau de la membrane plasmique des cellules.

B. Etude de l'expression intracellulaire des VHH dans la lignée cellulaire N2A

Des cellules N2A (neuroblastomes murins) ont été déposées à une densité de 100 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits contenant des lamelles préalablement traitées avec une solution de « coating ». Une fois que les cellules sont à 60% confluentes, elles sont transfectées avec les différentes constructions plasmidiques pEM-15 GFP-Tau-1N4R et/ou pmCherry-N1 F8-2. Les mix de transfections ont été réalisés avec du milieu DMEM (Gibco) contenant 250 ng de plasmide F8-2-mCherry et 750 ng de plasmide Tau-GFP et 1,5 μ L de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) pour un volume total de 40 μ L par puit. Les différents mix sont incubés pendant 20 minutes à température ambiante puis ajoutés aux cellules. Les cellules sont incubées pendant 24 heures puis elles sont rincées au PBS et post fixées avec du paraformaldéhyde (PAF) 4% pendant 20 minutes. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, NH₄Cl 50 nM et marquées avec du DAPI (1:5000) pendant 10 minutes. Les lamelles sont montées sur des lames superfrost avec du milieu de montage DAKO (Agilent). Les clichés de microscopie de fluorescence ont été enregistrés avec un microscope confocal (LSM 710 Zeiss) en utilisant le logiciel Zen Black (Zeiss Microscope).

C. Etudes réalisées *in vivo* chez les souris THY-Tau30 et littermates

i. Injections intrapéritonéales du VHH E4-1 c-Myc

Le VHH E4-1 c-Myc, produit de façon recombinante, a été administré de manière intrapéritonéale et à trois concentrations différentes (0,375 mg/mL, 0,750 mg/mL, et 1,5 mg/mL) dans des souris sauvages (lignée C57BL/6) homozygotes provenant du croisement des souris THY-Tau30. Les animaux ont reçu deux injections espacées de 48 heures. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale 24 heures après la deuxième injection. Des dissections du rein et différentes structures du cerveau ont été réalisées afin de les analyser par western-blot.

ii. Injections intra-crânielles

Les injections stéréotaxiques du VHH E4-1 c-Myc (incubé préalablement dans du PBS pH 7.4), du VHH E4-1 c-Myc (incubé préalablement avec du lysat de cerveau Alzheimer), du lysat de cerveau Alzheimer (incubé préalablement avec du PBS), de vecteurs lentiviraux VHH anti-GFP et de vecteurs lentiviraux VHH Z70 ont été réalisées dans l'hippocampe de souris THY-Tau30 et littermates préalablement anesthésiées (ketamine 100 mg/kg, xylazine 10 mg/kg). Les injections ont été réalisées en utilisant une seringue Hamilton de 10 µL pour délivrer 2 µL de matériel à un débit de 0,2 µL par minute. Suite à l'injection, un temps d'attente de 5 minutes a été opéré afin de permettre la diffusion de la solution dans l'hippocampe.

Les VHH E4-1 c-Myc incubé avec du PBS (2 µL, 7µg/µL), E4-1 c-Myc incubé avec du lysat Alzheimer (2 µL, 7µg/µL E4-1 c-Myc, 5,5µg/µL Lysat MA) et du lysat Alzheimer incubé avec du PBS (2 µL, 5,5µg/µL) ont été injectés de façon bilatérale dans l'hippocampe de souris THY-Tau30 âgées d'un mois. Les VHH E4-1 c-Myc incubé avec du PBS (2 µL, 7µg/µL) et E4-1 c-Myc incubé avec du lysat Alzheimer (2 µL, 7µg/µL E4-1 c-Myc, 5,5µg/µL Lysat MA) ont été injectés de façon bilatérale dans l'hippocampe de souris littermates âgées d'un mois. Les injections ont été réalisées selon les coordonnées suivants: Antéro-Postérieur: -2.5 mm; Media-Latéral: -1 mm, + 1 mm; Dorso-Ventral: -1.8 mm en bregma. Les souris sont anesthésiées puis sont perfusées intracardiaquement avec du sérum physiologique NaCl 0.9% puis du

paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes une heure, six heures ou 18 heures après l'injection.

Les lentivirus VHH anti-GFP et VHH Z70 (2 μ L, 200 ng/ μ L) ont été injectés de façon bilatérale dans l'hippocampe de souris THY-Tau30 âgées de trois mois. Deux semaines plus tard, du lysat Alzheimer ou du PBS ont été de nouveau injectés dans les mêmes souris (2 μ L, 5,5 μ g/ μ L). Les injections ont été réalisées en suivant ces coordonnées : Antéro-Postérieur: -2.5 mm; Media-Latéral: -1,5 mm, + 1,5 mm; Dorso-Ventral: -1.5 mm en bregma. Les souris sont anesthésiées puis sont perfusées intracardiaquement avec du sérum physiologique NaCl 0.9% puis du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes un mois après la deuxième injection, à l'âge de quatre mois et demie

iii. Immunofluorescence

Suite à la perfusion intra-cardiaque au PAF (4%), les cerveaux sont disséqués puis post-fixés sur une nuit dans une solution de PAF à 4% à 4°C. Les cerveaux sont transférés dans une solution de sucrose 20% pendant 24 heures puis congelés dans l'isopentane et stockés à -80°C. Des coupes coronales (40 microns) sont réalisées avec un microtome cryostat. Les coupes sont conservées dans du PBS azide (0,2%) à 4°C. Après lavage dans du PBS Triton (0,2%), les coupes sont transférées dans une solution de saturation MOM (Mouse blocking reagent ; Vector Laboratories) pendant une heure puis incubées avec l'anticorps primaire anti c-Myc (1:250, Thermofisher) sur la nuit à 4°C. Après lavages au PBS Triton (0,2%), les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire Tau C-ter (1:1000, généré chez le lapin au laboratoire) sur la nuit à 4°C. Les coupes sont de nouveau rincées avec du PBS Triton (0,2%) puis incubées pendant une heure avec les anticorps secondaires anti-souris Alexa 488 nm (1:1000, fluorescence verte) et anti-lapin Alexa 568 nm (1 :1000, fluorescence rouge). Les coupes sont par la suite rincées au PBS puis montées sur des lames superfrost. Les lamelles sont montées sur les lames avec du Vectashield + DAPI (Vector Laboratories). Les clichés de microscopie de fluorescence ont été enregistrés avec un microscope confocal (LSM 710 Zeiss) en utilisant le logiciel Zen Black (Zeiss Microscope).

iv. Western-blot

Les structures cérébrales (hippocampe, régions sous corticales, cortex et cervelet) ainsi que le rein sont repris dans du PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéases (Roche) puis potterisés. Après dosage au BCA (« bicinchonic acid assay »), les échantillons sont déposés (30 µg) sur un gel 12% Bis-Tris Criterion (BioRad). Suite à la migration, les échantillons sont transférés sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm. La membrane est ensuite incubée avec un tampon de saturation avec 5% de BSA puis incubée avec l'anticorps primaire anti c-Myc (1:250, Thermofisher) sur la nuit à 4°C. La membrane est rincée puis de nouveau incubée avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la HRP. La révélation est réalisée avec le réactif ECL (GE Healthcare) et les immunoempreintes sont obtenues en utilisant un Imager 600 (GE Healthcare).

Bibliographie

- 2018 Alzheimer's disease facts and figures, 2018. . *Alzheimers Dement.* 14, 367–429.
<https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>
- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T.C., Cryns, V., Berry, R.W., Kuret, J., Binder, L.I., 2000. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J. Cell Sci.* 113 Pt 21, 3737–3745.
- Abulrob, A., Sprong, H., Van Bergen en Henegouwen, P., Stanimirovic, D., 2005. The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J. Neurochem.* 95, 1201–1214.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x>
- Adams, S.J., DeTure, M.A., McBride, M., Dickson, D.W., Petrucelli, L., 2010. Three repeat isoforms of tau inhibit assembly of four repeat tau filaments. *PLoS One* 5, e10810.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010810>
- Alley, S.C., Okeley, N.M., Senter, P.D., 2010. Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 529–537.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.170>
- Alonso, A. del C., Grundke-Iqbal, I., Barra, H.S., Iqbal, K., 1997. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 298–303.
- Alonso, A. del C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2004. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J. Biol. Chem.* 279, 34873–34881. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405131200>
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 2001. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6923–6928.
<https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>
- Andrew, R.J., Kellett, K.A.B., Thinakaran, G., Hooper, N.M., 2016. A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J. Biol. Chem.* 291, 19235–19244. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.746032>
- Arai, T., Ikeda, K., Akiyama, H., Nonaka, T., Hasegawa, M., Ishiguro, K., Iritani, S., Tsuchiya, K., Iseki, E., Yagishita, S., Oda, T., Mochizuki, A., 2004. Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann. Neurol.* 55, 72–79.
<https://doi.org/10.1002/ana.10793>
- Araste, F., Ebrahimzadeh, W., Rasooli, I., Rajabibazl, M., Mousavi Gargari, S.L., 2014. A novel VHH nanobody against the active site (the CA domain) of tumor-associated, carbonic anhydrase isoform IX and its usefulness for cancer diagnosis. *Biotechnol. Lett.* 36, 21–28. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1340-1>
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., Muyldermans, S., 1997. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 414, 521–526.
- Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., MacKenzie, R., 2005. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 501–519. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-6193-1>
- Arendt, T., Holzer, M., Grossmann, A., Zedlick, D., Brückner, M.K., 1995. Increased expression and subcellular translocation of the mitogen activated protein kinase kinase and mitogen-activated protein kinase in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 68, 5–18.
- Armstrong, D.J., Roman, A., 1993. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 1380–1387.
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1569>

- Asuni, A.A., Boutajangout, A., Quartermain, D., Sigurdsson, E.M., 2007. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9115–9129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>
- Avila, J., Jiménez, J.S., Sayas, C.L., Bolós, M., Zabala, J.C., Rivas, G., Hernández, F., 2016. Tau Structures. *Front. Aging Neurosci.* 8, 262. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00262>
- Baranger, K., Marchalant, Y., Bonnet, A.E., Crouzin, N., Carrete, A., Paumier, J.-M., Py, N.A., Bernard, A., Bauer, C., Charrat, E., Moschke, K., Seiki, M., Vignes, M., Lichtenthaler, S.F., Checler, F., Khrestchatsky, M., Rivera, S., 2016. MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 217–236. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1992-1>
- Baranova, E., Fronzes, R., Garcia-Pino, A., Van Gerven, N., Papapostolou, D., Péhau-Arnaudet, G., Pardon, E., Steyaert, J., Howorka, S., Remaut, H., 2012. SbsB structure and lattice reconstruction unveil Ca²⁺ triggered S-layer assembly. *Nature* 487, 119–122. <https://doi.org/10.1038/nature11155>
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D., 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. *Nat. Med.* 6, 916–919. <https://doi.org/10.1038/78682>
- Batra, S.K., Jain, M., Wittel, U.A., Chauhan, S.C., Colcher, D., 2002. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 603–608.
- Behdani, M., Zeinali, S., Karimipour, M., Khanahmad, H., Schoonooghe, S., Aslemarz, A., Seyed, N., Moazami-Godarzi, R., Baniahmad, F., Habibi-Anbouhi, M., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Muyltermans, S., 2013. Development of VEGFR2-specific Nanobody *Pseudomonas* exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth. *New Biotechnol.* 30, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.09.002>
- Berry, R.W., Abraha, A., Lagalwar, S., LaPointe, N., Gamblin, T.C., Cryns, V.L., Binder, L.I., 2003. Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry* 42, 8325–8331. <https://doi.org/10.1021/bi027348m>
- Bhattacharya, K., Rank, K.B., Evans, D.B., Sharma, S.K., 2001. Role of cysteine-291 and cysteine-322 in the polymerization of human tau into Alzheimer-like filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 20–26. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5116>
- 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, 153–163.
- Booth, D.R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C.V., Hutchinson, W.L., Fraser, P.E., Hawkins, P.N., Dobson, C.M., Radford, S.E., Blake, C.C., Pepys, M.B., 1997. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 385, 787–793. <https://doi.org/10.1038/385787a0>
- Boutajangout, A., Quartermain, D., Sigurdsson, E.M., 2010. Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 16559–16566. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010>
- 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* 68, 1809–1814. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000262031.18018.1a>

- Boxer, A.L., Lang, A.E., Grossman, M., Knopman, D.S., Miller, B.L., Schneider, L.S., Doody, R.S., Lees, A., Golbe, L.I., Williams, D.R., Corvol, J.-C., Ludolph, A., Burn, D., Lorenzl, S., Litvan, I., Roberson, E.D., Höglinger, G.U., Koestler, M., Jack, C.R., Van Deerlin, V., Randolph, C., Lobach, I.V., Heuer, H.W., Gozes, I., Parker, L., Whitaker, S., Hirman, J., Stewart, A.J., Gold, M., Morimoto, B.H., AL-108-231 Investigators, 2014. Davunetide in patients with progressive supranuclear palsy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2/3 trial. *Lancet Neurol.* 13, 676–685. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70088-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70088-2)
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., Del Tredici, K., 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 112, 389–404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>
- Braak, H., Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 239–259.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Passareiro, E., Flament-Durand, J., 1985. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 89–96.
- Brion, J.-P., Passareido, H., Nunez, J., Flament-Durand, J., 1985. Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol.*
- Brion, J.P., Tremp, G., Octave, J.N., 1999. Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 154, 255–270. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65272-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65272-8)
- Brion, S., Plas, J., Jeanneau, A., 1991. [Pick's disease. Anatomico-clinical point of view]. *Rev. Neurol. (Paris)* 147, 693–704.
- Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
- Buée Scherrer, V., Hof, P.R., Buée, L., Leveugle, B., Vermersch, P., Perl, D.P., Olanow, C.W., Delacourte, A., 1996. Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 91, 351–359.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., Wong, P.C., 2001. BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 233–234. <https://doi.org/10.1038/85064>
- Canet, D., Last, A.M., Tito, P., Sunde, M., Spencer, A., Archer, D.B., Redfield, C., Robinson, C.V., Dobson, C.M., 2002. Local cooperativity in the unfolding of an amyloidogenic variant of human lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* 9, 308–315. <https://doi.org/10.1038/nsb768>
- Carlomagno, Y., Chung, D.C., Yue, M., Castanedes-Casey, M., Madden, B.J., Dunmore, J., Tong, J., DeTure, M., Dickson, D.W., Petrucelli, L., Cook, C., 2017. An acetylation–phosphorylation switch that regulates tau aggregation propensity and function. *J. Biol. Chem.* 292, 15277–15286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.794602>
- Chai, X., Dage, J.L., Citron, M., 2012. Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiol. Dis.* 48, 356–366. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.021>
- Chan, P.-H., Pardon, E., Menzer, L., De Genst, E., Kumita, J.R., Christodoulou, J., Saerens, D., Brans, A., Bouillenne, F., Archer, D.B., Robinson, C.V., Muyldermans, S., Matagne, A., Redfield, C., Wyns, L., Dobson, C.M., Dumoulin, M., 2008. Engineering a camelid antibody fragment that binds to the active site of human lysozyme and inhibits its conversion into amyloid fibrils. *Biochemistry* 47, 11041–11054. <https://doi.org/10.1021/bi8005797>

- Chothia, C., Novotný, J., Brucoleri, R., Karplus, M., 1985. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J. Mol. Biol.* 186, 651–663.
- Clark, C.M., Schneider, J.A., Bedell, B.J., Beach, T.G., Bilker, W.B., Mintun, M.A., Pontecorvo, M.J., Hefti, F., Carpenter, A.P., Flitter, M.L., Krautkramer, M.J., Kung, H.F., Coleman, R.E., Doraiswamy, P.M., Fleisher, A.S., Sabbagh, M.N., Sadowsky, C.H., Reiman, E.P., Reiman, P.E.M., Zehntner, S.P., Skovronsky, D.M., AV45-A07 Study Group, 2011. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *JAMA* 305, 275–283. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.2008>
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R.A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., Winkler, D.T., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Ghetti, B., Goedert, M., Tolnay, M., 2013. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R.A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A.K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., Tolnay, M., 2009. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.* 11, 909–913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
- Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326 (Pt 1), 1–16.
- Cohen, T.J., Guo, J.L., Hurtado, D.E., Kwong, L.K., Mills, I.P., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y., 2011. The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat. Commun.* 2, 252. <https://doi.org/10.1038/ncomms1255>
- Congdon, E.E., Sigurdsson, E.M., 2018. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>
- Conrath, K.E., Wernery, U., Muyldermans, S., Nguyen, V.K., 2003. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev. Comp. Immunol.* 27, 87–103.
- Cook, C., Carlomagno, Y., Gendron, T.F., Dunmore, J., Scheffel, K., Stetler, C., Davis, M., Dickson, D., Jarpe, M., DeTure, M., Petrucelli, L., 2014. Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance. *Hum. Mol. Genet.* 23, 104–116. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt402>
- Cooper, M.A., 2002. Optical biosensors in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 515–528. <https://doi.org/10.1038/nrd838>
- Corcoran, N.M., Martin, D., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Nguyen, T., Nheu, L., Sundstrom, L.E., Costello, A.J., Hovens, C.M., 2010. Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 17, 1025–1033. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.04.020>
- Cortez-Retamozo, V., Backmann, N., Senter, P.D., Wernery, U., De Baetselier, P., Muyldermans, S., Revets, H., 2004. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.* 64, 2853–2857.
- Courade, J.-P., Angers, R., Mairet-Coello, G., Pacico, N., Tyson, K., Lightwood, D., Munro, R., McMillan, D., Griffin, R., Baker, T., Starkie, D., Nan, R., Westwood, M., Mushikiwabo, M.-L., Jung, S., Odede, G., Sweeney, B., Popplewell, A., Burgess, G., Downey, P., Citron, M., 2018. Epitope determines efficacy of therapeutic anti-Tau antibodies in a functional assay with human Alzheimer Tau. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1911-2>
- Cuchillo-Ibanez, I., Seereeram, A., Byers, H.L., Leung, K.-Y., Ward, M.A., Anderton, B.H., Hanger, D.P., 2008. Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 3186–3195. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109181>
- d'Orange, M., Aurégan, G., Cheramy, D., Gaudin-Guérif, M., Lieger, S., Guillemier, M., Stimmer, L., Joséphine, C., Hérard, A.-S., Gaillard, M.-C., Petit, F., Kiessling, M.C.,

- Schmitz, C., Colin, M., Buée, L., Panayi, F., Diguët, E., Brouillet, E., Hantraye, P., Bemelmans, A.-P., Cambon, K., 2018. Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain* 141, 535–549.
<https://doi.org/10.1093/brain/awx342>
- Dai, C., 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. *Alzheimers Res. Ther.* 10.
<https://doi.org/10.1186/s13195-018-0341-7>
- Dai, C.-L., Tung, Y.C., Liu, F., Gong, C.-X., Iqbal, K., 2017. Tau passive immunization inhibits not only tau but also A β pathology. *Alzheimers Res. Ther.* 9, 1.
<https://doi.org/10.1186/s13195-016-0227-5>
- Daneman, R., Prat, A., 2015. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Dayanandan, R., Van Slegtenhorst, M., Mack, T.G., Ko, L., Yen, S.H., Leroy, K., Brion, J.P., Anderton, B.H., Hutton, M., Lovestone, S., 1999. Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett.* 446, 228–232.
- De Genst, E., Chan, P.-H., Pardon, E., Hsu, S.-T.D., Kumita, J.R., Christodoulou, J., Menzer, L., Chirgadze, D.Y., Robinson, C.V., Muyldermans, S., Matagne, A., Wyns, L., Dobson, C.M., Dumoulin, M., 2013. A nanobody binding to non-amyloidogenic regions of the protein human lysozyme enhances partial unfolding but inhibits amyloid fibril formation. *J. Phys. Chem. B* 117, 13245–13258. <https://doi.org/10.1021/jp403425z>
- De Genst, E., Silence, K., Decanniere, K., Conrath, K., Loris, R., Kinne, J., Muyldermans, S., Wyns, L., 2006. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4586–4591.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505379103>
- De Genst, E., Silence, K., Ghahroudi, M.A., Decanniere, K., Loris, R., Kinne, J., Wyns, L., Muyldermans, S., 2005. Strong in vivo maturation compensates for structurally restricted H3 loops in antibody repertoires. *J. Biol. Chem.* 280, 14114–14121.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M413011200>
- De Genst, E.J., Williams, T., Wellens, J., O’Day, E.M., Waudby, C.A., Meehan, S., Dumoulin, M., Hsu, S.-T.D., Cremades, N., Verschueren, K.H.G., Pardon, E., Wyns, L., Steyaert, J., Christodoulou, J., Dobson, C.M., 2010. Structure and properties of a complex of α -synuclein and a single-domain camelid antibody. *J. Mol. Biol.* 402, 326–343.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.001>
- Decanniere, K., Muyldermans, S., Wyns, L., 2000. Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? Edited by J. Thornton. *J. Mol. Biol.* 300, 83–91. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3839>
- del Ser, T., Steinwachs, K.C., Gertz, H.J., Andrés, M.V., Gómez-Carrillo, B., Medina, M., Vericat, J.A., Redondo, P., Fleet, D., León, T., 2013. Treatment of Alzheimer’s disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study. *J. Alzheimers Dis. JAD* 33, 205–215.
<https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120805>
- Delacourte, A., Robitaille, Y., Sergeant, N., Buée, L., Hof, P.R., Watzet, A., Laroche-Chollette, A., Mathieu, J., Chagnon, P., Gauvreau, D., 1996. Specific pathological Tau protein variants characterize Pick’s disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 159–168.
- Denk, F., Wade-Martins, R., 2009. Knock-out and transgenic mouse models of tauopathies. *Neurobiol. Aging* 30, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.05.010>
- Derisbourg, M., Leghay, C., Chiappetta, G., Fernandez-Gomez, F.-J., Laurent, C., Demeyer, D., Carrier, S., Buée-Scherrer, V., Blum, D., Vinh, J., Sergeant, N., Verdier, Y., Buée, L., Hamdane, M., 2015. Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization

- revealed by new endogenous truncated forms. *Sci. Rep.* 5, 9659.
<https://doi.org/10.1038/srep09659>
- Desmyter, A., Spinelli, S., Payan, F., Lauwereys, M., Wyns, L., Muyldermans, S., Cambillau, C., 2002. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic alpha-amylase. Inhibition and versatility of binding topology. *J. Biol. Chem.* 277, 23645–23650. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202327200>
- Desmyter, A., Transue, T.R., Ghahroudi, M.A., Thi, M.H., Poortmans, F., Hamers, R., Muyldermans, S., Wyns, L., 1996. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* 3, 803–811.
- Despres, C., Byrne, C., Qi, H., Cantrelle, F.-X., Huvent, I., Chambraud, B., Baulieu, E.-E., Jacquot, Y., Landrieu, I., Lippens, G., Smet-Nocca, C., 2017. Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.1708448114>
- Dickson, D.W., Farlo, J., Davies, P., Crystal, H., Fuld, P., Yen, S.H., 1988. Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques. *Am. J. Pathol.* 132, 86–101.
- Domanska, K., Vanderhaegen, S., Srinivasan, V., Pardon, E., Dupeux, F., Marquez, J.A., Giorgetti, S., Stoppini, M., Wyns, L., Bellotti, V., Steyaert, J., 2011. Atomic structure of a nanobody-trapped domain-swapped dimer of an amyloidogenic β -microglobulin variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1314–1319.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1008560108>
- Doody, R.S., Thomas, R.G., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., Kieburtz, K., Raman, R., Sun, X., Aisen, P.S., Siemers, E., Liu-Seifert, H., Mohs, R., Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee, Solanezumab Study Group, 2014. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 370, 311–321. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312889>
- Dorresteyn, B., Rotman, M., Faber, D., Schraivesande, R., Suidgeest, E., van der Weerd, L., van der Maarel, S.M., Verrips, C.T., El Khattabi, M., 2015. Camelid heavy chain only antibody fragment domain against β -site of amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 inhibits β -secretase activity in vitro and in vivo. *FEBS J.* 282, 3618–3631.
<https://doi.org/10.1111/febs.13367>
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1995. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.* 270, 7679–7688.
- D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V.M.-Y., Bird, T.D., Schellenberg, G.D., 1999. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5598–5603.
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Delattre, L., Carrier, S., Loyens, A., Galas, M.-C., Bousset, L., Melki, R., Aurégan, G., Hantraye, P., Brouillet, E., Buée, L., Colin, M., 2014a. Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One* 9, e100760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>
- Dujardin, S., Lécolle, K., Caillierez, R., Bégard, S., Zommer, N., Lachaud, C., Carrier, S., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Colin, M., Buée, L., 2014b. Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 14.
<https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>

- Dumoulin, M., 2010. Familial Amyloidosis Caused by Lysozyme, in: Protein Misfolding Diseases. Wiley-Blackwell, pp. 867–885.
<https://doi.org/10.1002/9780470572702.ch39>
- Dumoulin, M., Conrath, K., Van Meirhaeghe, A., Meersman, F., Heremans, K., Frenken, L.G.J., Muyldermans, S., Wyns, L., Matagne, A., 2002. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 11, 500–515.
<https://doi.org/10.1110/ps.34602>
- Dumoulin, M., Kumita, J.R., Dobson, C.M., 2006. Normal and aberrant biological self-assembly: Insights from studies of human lysozyme and its amyloidogenic variants. *Acc. Chem. Res.* 39, 603–610. <https://doi.org/10.1021/ar050070g>
- Dumoulin, M., Last, A.M., Desmyter, A., Decanniere, K., Canet, D., Larsson, G., Spencer, A., Archer, D.B., Sasse, J., Muyldermans, S., Wyns, L., Redfield, C., Matagne, A., Robinson, C.V., Dobson, C.M., 2003. A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature* 424, 783–788.
<https://doi.org/10.1038/nature01870>
- Dunker, A.K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E.C., Brown, C.J., 2000. Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform. Workshop Genome Inform.* 11, 161–171.
- Dyson, H.J., Wright, P.E., 2005. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 197–208. <https://doi.org/10.1038/nrm1589>
- Edison, P., Archer, H.A., Hinz, R., Hammers, A., Pavese, N., Tai, Y.F., Hottot, G., Cutler, D., Fox, N., Kennedy, A., Rossor, M., Brooks, D.J., 2007. Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [¹¹C]PIB and [¹⁸F]FDG PET study. *Neurology* 68, 501–508. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000244749.20056.d4>
- Elie, A., Prezel, E., Guérin, C., Denarier, E., Ramirez-Rios, S., Serre, L., Andrieux, A., Fourest-Lieuvin, A., Blanchoin, L., Arnal, I., 2015. Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks. *Sci. Rep.* 5, 9964. <https://doi.org/10.1038/srep09964>
- Els Conrath, K., Lauwereys, M., Wyns, L., Muyldermans, S., 2001. Camel single-domain antibodies as modular building units in bispecific and bivalent antibody constructs. *J. Biol. Chem.* 276, 7346–7350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007734200>
- Emmerson, C.D., van der Vlist, E.J., Braam, M.R., Vanlandschoot, P., Merchiers, P., de Haard, H.J.W., Verrips, C.T., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Dolk, E., 2011. Enhancement of polymeric immunoglobulin receptor transcytosis by biparatopic VHH. *PloS One* 6, e26299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026299>
- Fá, M., Puzzo, D., Piacentini, R., Staniszewski, A., Zhang, H., Baltrons, M.A., Li Puma, D.D., Chatterjee, I., Li, J., Saeed, F., Berman, H.L., Ripoli, C., Gulisano, W., Gonzalez, J., Tian, H., Costa, J.A., Lopez, P., Davidowitz, E., Yu, W.H., Haroutunian, V., Brown, L.M., Palmeri, A., Sigurdsson, E.M., Duff, K.E., Teich, A.F., Honig, L.S., Sierks, M., Moe, J.G., D’Adamio, L., Grassi, C., Kanaan, N.M., Fraser, P.E., Arancio, O., 2016. Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory. *Sci. Rep.* 6, 19393. <https://doi.org/10.1038/srep19393>
- Falcon, B., Cavallini, A., Angers, R., Glover, S., Murray, T.K., Barnham, L., Jackson, S., O’Neill, M.J., Isaacs, A.M., Hutton, M.L., Szekeres, P.G., Goedert, M., Bose, S., 2015. Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J. Biol. Chem.* 290, 1049–1065.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589309>
- Falcon, B., Zhang, W., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Vidal, R., Crowther, R.A., Ghetti, B., Scheres, S.H.W., Goedert, M., 2018. Structures of filaments from Pick’s disease reveal a novel tau protein fold. *Nature* 1. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0454-y>

- Fichou, Y., Vigers, M., Goring, A.K., Eschmann, N.A., Han, S., 2018. Heparin-induced tau filaments are structurally heterogeneous and differ from Alzheimer's disease filaments. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 54, 4573–4576. <https://doi.org/10.1039/c8cc01355a>
- Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M., Scheres, S.H.W., 2017. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature23002>
- Flajnik, M.F., Deschacht, N., Muyldermans, S., 2011. A Case Of Convergence: Why Did a Simple Alternative to Canonical Antibodies Arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol.* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001120>
- Forlenza, O.V., Diniz, B.S., Radanovic, M., Santos, F.S., Talib, L.L., Gattaz, W.F., 2011. Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* 198, 351–356. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.110.080044>
- Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1998. Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry* 37, 10223–10230. <https://doi.org/10.1021/bi980537d>
- Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I., 2009. Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Gamblin, T.C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A.L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R.W., Binder, L.I., Cryns, V.L., 2003. Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10032–10037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1630428100>
- Gauthier, S., Feldman, H.H., Schneider, L.S., Wilcock, G.K., Frisoni, G.B., Hardlund, J.H., Moebius, H.J., Bentham, P., Kook, K.A., Wischik, D.J., Schelter, B.O., Davis, C.S., Staff, R.T., Bracoud, L., Shamsi, K., Storey, J.M.D., Harrington, C.R., 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. *Lancet Lond. Engl.* 388, 2873–2884. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31275-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31275-2)
- Ghetti, B., Oblak, A.L., Boeve, B.F., Johnson, K.A., Dickerson, B.C., Goedert, M., 2015. Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 41, 24–46. <https://doi.org/10.1111/nan.12213>
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussi re, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., Hof, P.R., 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60, 1495–1500.
- Glenner, G.G., Wong, C.W., 1984. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 1131–1135.
- Goedert, M., Clavaguera, F., Tolnay, M., 2010. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 33, 317–325. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.04.003>
- Goedert, M., Jakes, R., 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* 9, 4225–4230.
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J., Crowther, R.A., 1996. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments

- induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383, 550–553.
<https://doi.org/10.1038/383550a0>
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., Crowther, R.A., 1992. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168.
- Gong, R., Chen, W., Dimitrov, D.S., 2012. Expression, purification, and characterization of engineered antibody CH2 and VH domains. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 899, 85–102. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_6
- Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., Feinstein, S.C., 1997. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol. Biol. Cell* 8, 353–365.
- Gorsky, M.K., Burnouf, S., Dols, J., Mandelkow, E., Partridge, L., 2016. Acetylation mimic of lysine 280 exacerbates human Tau neurotoxicity in vivo. *Sci. Rep.* 6, 22685.
<https://doi.org/10.1038/srep22685>
- Götz, J., Probst, A., Spillantini, M.G., Schäfer, T., Jakes, R., Bürki, K., Goedert, M., 1995. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.* 14, 1304–1313.
- Govaert, J., Pellis, M., Deschacht, N., Vincke, C., Conrath, K., Muyldermans, S., Saerens, D., 2012. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *J. Biol. Chem.* 287, 1970–1979.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242818>
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E., 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8342–8347.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0402254101>
- Greenberg, A.S., Avila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E.C., Flajnik, M.F., 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature* 374, 168–173. <https://doi.org/10.1038/374168a0>
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., Binder, L.I., 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4913–4917.
- Guidotti, G., Brambilla, L., Rossi, D., 2017. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 406–424.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.01.003>
- Guilliams, T., El-Turk, F., Buell, A.K., O’Day, E.M., Aprile, F.A., Esbjörner, E.K., Vendruscolo, M., Cremades, N., Pardon, E., Wyns, L., Welland, M.E., Steyaert, J., Christodoulou, J., Dobson, C.M., De Genst, E., 2013. Nanobodies raised against monomeric α -synuclein distinguish between fibrils at different maturation stages. *J. Mol. Biol.* 425, 2397–2411. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.040>
- Guillozet-Bongaarts, A.L., Glajch, K.E., Libson, E.G., Cahill, M.E., Bigio, E., Berry, R.W., Binder, L.I., 2007. Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 113, 513–520. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0209-6>
- Guo, T., Noble, W., Hanger, D.P., 2017. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Habicht, G., Haupt, C., Friedrich, R.P., Hortschansky, P., Sachse, C., Meinhardt, J., Wieligmann, K., Gellermann, G.P., Brodhun, M., Götz, J., Halbhuber, K.-J., Röcken, C., Horn, U., Fändrich, M., 2007. Directed selection of a conformational antibody domain that prevents mature amyloid fibril formation by stabilizing A β protofibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19232–19237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703793104>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hamers, R., 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>

- Hanger, D.P., Anderton, B.H., Noble, W., 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* 15, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003>
- Hardy, J., Allsop, D., 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Hasegawa, M., Smith, M.J., Goedert, M., 1998. Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett.* 437, 207–210.
- Hastings, N.B., Wang, X., Song, L., Butts, B.D., Grotz, D., Hargreaves, R., Fred Hess, J., Hong, K.-L.K., Huang, C.R.-R., Hyde, L., Laverty, M., Lee, J., Levitan, D., Lu, S.X., Maguire, M., Mahadomrongkul, V., McEachern, E.J., Ouyang, X., Rosahl, T.W., Selnick, H., Stanton, M., Terracina, G., Vocadlo, D.J., Wang, G., Duffy, J.L., Parker, E.M., Zhang, L., 2017. Inhibition of O-GlcNAcase leads to elevation of O-GlcNAc tau and reduction of tauopathy and cerebrospinal fluid tau in rTg4510 mice. *Mol. Neurodegener.* 12. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0181-0>
- Head, M.W., Ironside, J.W., 2012. Review: Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 38, 296–310. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2012.01265.x>
- Herce, H.D., Schumacher, D., Schneider, A.F.L., Ludwig, A.K., Mann, F.A., Fillies, M., Kasper, M.-A., Reinke, S., Krause, E., Leonhardt, H., Cardoso, M.C., Hackenberger, C.P.R., 2017. Cell-permeable nanobodies for targeted immunolabelling and antigen manipulation in living cells. *Nat. Chem.* 9, 762–771. <https://doi.org/10.1038/nchem.2811>
- Hippius, H., Neundörfer, G., 2003. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues Clin. Neurosci.* 5, 101–108.
- Holliger, P., Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126–1136. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>
- Holmes, B.B., DeVos, S.L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M.O., Brodsky, F.M., Marasa, J., Bagchi, D.P., Kotzbauer, P.T., Miller, T.M., Papy-Garcia, D., Diamond, M.I., 2013. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E3138–E3147. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>
- Holmes, B.B., Furman, J.L., Mahan, T.E., Yamasaki, T.R., Mirbaha, H., Eades, W.C., Belaygorod, L., Cairns, N.J., Holtzman, D.M., Diamond, M.I., 2014. Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4376–4385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411649111>
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B.I., Geschwind, D.H., Bird, T.D., McKeel, D., Goate, A., Morris, J.C., Wilhelmsen, K.C., Schellenberg, G.D., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 1998. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914–1917.
- Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.-L., Ashe, K.H., Liao, D., 2010. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>
- Hu, C.C., Ghabrial, S.A., 1995. The conserved, hydrophilic and arginine-rich N-terminal domain of cucumovirus coat proteins contributes to their anomalous electrophoretic

- mobilities in sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels. *J. Virol. Methods* 55, 367–379.
- Hu, Y., Liu, C., Muyldermans, S., 2017. Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01442>
- Ikeda, K., Akiyama, H., Arai, T., Tsuchiya, K., 2002. Pick-body-like inclusions in corticobasal degeneration differ from Pick bodies in Pick's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 115–118. <https://doi.org/10.1007/s004010100440>
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Götz, J., 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P.M., Jiang, Y., Schmidt, S.D., Chishti, M.A., Horne, P., Heslin, D., French, J., Mount, H.T., Nixon, R.A., Mercken, M., Bergeron, C., Fraser, P.E., St George-Hyslop, P., Westaway, D., 2000. A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 979–982. <https://doi.org/10.1038/35050110>
- Jefferis, R., 2005. Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol. Prog.* 21, 11–16. <https://doi.org/10.1021/bp040016j>
- Jeganathan, S., von Bergen, M., Brutlach, H., Steinhoff, H.-J., Mandelkow, E., 2006. Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* 45, 2283–2293. <https://doi.org/10.1021/bi0521543>
- Kamah, A., Huvent, I., Cantrelle, F.-X., Qi, H., Lippens, G., Landrieu, I., Smet-Nocca, C., 2014. Nuclear magnetic resonance analysis of the acetylation pattern of the neuronal Tau protein. *Biochemistry* 53, 3020–3032. <https://doi.org/10.1021/bi500006v>
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., Malinow, R., 2003. APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.
- Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1996. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* 399, 344–349.
- Katsinelos, T., Zeitler, M., Dimou, E., Karakatsani, A., Müller, H.-M., Nachman, E., Steringer, J.P., Ruiz de Almodovar, C., Nickel, W., Jahn, T.R., 2018. Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Rep.* 23, 2039–2055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>
- Kellogg, E.H., Hejab, N.M.A., Poepsel, S., Downing, K.H., DiMaio, F., Nogales, E., 2018. Near-atomic model of microtubule-tau interactions. *Science* 360, 1242–1246. <https://doi.org/10.1126/science.aat1780>
- Kfoury, N., Holmes, B.B., Jiang, H., Holtzman, D.M., Diamond, M.I., 2012. Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J. Biol. Chem.* 287, 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., Mandelkow, E.-M., 2006. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J. Biol. Chem.* 281, 1205–1214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507753200>
- Kidd, M., 1963. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192–193.
- Kimura, Y., Ichise, M., Ito, H., Shimada, H., Ikoma, Y., Seki, C., Takano, H., Kitamura, S., Shinotoh, H., Kawamura, K., Zhang, M.-R., Sahara, N., Suhara, T., Higuchi, M., 2015. PET Quantification of Tau Pathology in Human Brain with ¹¹C-PBB3. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* 56, 1359–1365. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.160127>

- Kopeikina, K.J., Carlson, G.A., Pitstick, R., Ludvigson, A.E., Peters, A., Luebke, J.I., Koffie, R.M., Frosch, M.P., Hyman, B.T., Spires-Jones, T.L., 2011. Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer's Disease Brain. *Am. J. Pathol.* 179, 2071–2082. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.004>
- Krishnamurthy, A., Jimeno, A., 2018. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacol. Ther.* 185, 122–134. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.002>
- Kumar, S., Tepper, K., Kaniyappan, S., Biernat, J., Wegmann, S., Mandelkow, E.-M., Müller, D.J., Mandelkow, E., 2014. Stages and Conformations of the Tau Repeat Domain during Aggregation and Its Effect on Neuronal Toxicity. *J. Biol. Chem.* 289, 20318–20332. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.554725>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Clos, A.L., Jackson, G.R., Kaye, R., 2011. Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol. Neurodegener.* 6, 39. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-39>
- Leroy, K., Ando, K., Héraud, C., Yilmaz, Z., Authélet, M., Boeynaems, J.-M., Buée, L., De Decker, R., Brion, J.-P., 2010. Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology. *J. Alzheimers Dis. JAD* 19, 705–719. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1276>
- Leroy, K., Bretteville, A., Schindowski, K., Gilissen, E., Authélet, M., De Decker, R., Yilmaz, Z., Buée, L., Brion, J.-P., 2007. Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 171, 976–992. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070345>
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X., Duff, K., Hardy, J., Corral, A., Lin, W.L., Yen, S.H., Dickson, D.W., Davies, P., Hutton, M., 2000. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat. Genet.* 25, 402–405. <https://doi.org/10.1038/78078>
- Li, C., Götz, J., 2017. Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation. *EMBO J.* 36, 3120–3138. <https://doi.org/10.15252/embj.201797724>
- Li, T., Bourgeois, J.-P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A.-M., Mecheri, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.-O., Rougeon, F., Lafaye, P., 2016a. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 3969–3979. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201384>
- Li, T., Vandesquille, M., Koukoulis, F., Duffant, C., Youssef, I., Lenormand, P., Ganneau, C., Maskos, U., Czech, C., Grueninger, F., Duyckaerts, C., Dhenain, M., Bay, S., Delatour, B., Lafaye, P., 2016b. Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 243, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019>
- Li, Y., Rinne, J.O., Mosconi, L., Pirraglia, E., Rusinek, H., DeSanti, S., Kempainen, N., Någren, K., Kim, B.-C., Tsui, W., de Leon, M.J., 2008. Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 2169–2181. <https://doi.org/10.1007/s00259-008-0833-y>

- Lim, S., Haque, M.M., Kim, D., Kim, D.J., Kim, Y.K., 2014. Cell-based Models To Investigate Tau Aggregation. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 12, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.09.011>
- Lindwall, G., Cole, R.D., 1984. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 259, 5301–5305.
- Lippens, G., Landrieu, I., Smet, C., Huvent, I., Gandhi, N.S., Gigant, B., Despres, C., Qi, H., Lopez, J., 2016. NMR Meets Tau: Insights into Its Function and Pathology. *Biomolecules* 6. <https://doi.org/10.3390/biom6020028>
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x>
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W., Gong, C.-X., 2004. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10804–10809. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400348101>
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3429–3436. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x>
- Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C.-X., 2002. Aberrant glycosylation modulates phosphorylation of tau by protein kinase A and dephosphorylation of tau by protein phosphatase 2A and 5. *Neuroscience* 115, 829–837.
- Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., Binder, L.I., 1990. Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 8422–8426.
- Lovestone, S., Boada, M., Dubois, B., Hüll, M., Rinne, J.O., Huppertz, H.-J., Calero, M., Andrés, M.V., Gómez-Carrillo, B., León, T., del Ser, T., ARGO investigators, 2015. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 45, 75–88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>
- Ma, Q.-L., Zuo, X., Yang, F., Ubeda, O.J., Gant, D.J., Alaverdyan, M., Teng, E., Hu, S., Chen, P.-P., Maiti, P., Teter, B., Cole, G.M., Frautschy, S.A., 2013. Curcumin suppresses soluble tau dimers and corrects molecular chaperone, synaptic, and behavioral deficits in aged human tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 288, 4056–4065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393751>
- Magen, I., Gozes, I., 2013. Microtubule-stabilizing peptides and small molecules protecting axonal transport and brain function: focus on davunetide (NAP). *Neuropeptides* 47, 489–495. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.011>
- Magne, F.O., Courbon, C.B., 2010. Tauopathies. *Neurologie.com* 2, 241–244. <https://doi.org/10.1684/nro.2010.0241>
- Malia, T.J., Teplyakov, A., Ernst, R., Wu, S.-J., Lacy, E.R., Liu, X., Vandermeeren, M., Mercken, M., Luo, J., Sweet, R.W., Gilliland, G.L., 2016. Epitope mapping and structural basis for the recognition of phosphorylated tau by the anti-tau antibody AT8. *Proteins* 84, 427–434. <https://doi.org/10.1002/prot.24988>
- Malpas, C.B., Vivash, L., Genc, S., Saling, M.M., Desmond, P., Steward, C., Hicks, R.J., Callahan, J., Brodtmann, A., Collins, S., Macfarlane, S., Corcoran, N.M., Hovens, C.M., Velakoulis, D., O'Brien, T.J., 2016. A Phase IIa Randomized Control Trial of VEL015 (Sodium Selenate) in Mild-Moderate Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 54, 223–232. <https://doi.org/10.3233/JAD-160544>
- Manczak, M., Reddy, P.H., 2013. RNA Silencing of Genes Involved in Alzheimer's Disease Enhances Mitochondrial Function and Synaptic Activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1832. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.008>
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Tailleur, A., Dumont, J., Issad, T., Gerhardt, E., Pagesy, P., Vileno, M., Bournonville, C., Hamdane, M., Bantubungi, K., Lancel, S., Demeyer, D., Eddarkaoui, S., Vallez, E., Vieau, D., Humez, S., Faivre, E., Grenier-Boley,

- B., Outeiro, T.F., Staels, B., Amouyel, P., Balschun, D., Buee, L., Blum, D., 2017. Tau deletion promotes brain insulin resistance. *J. Exp. Med.* 214, 2257–2269. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>
- Maruyama, M., Shimada, H., Suhara, T., Shinotoh, H., Ji, B., Maeda, J., Zhang, M.-R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Ono, M., Masamoto, K., Takano, H., Sahara, N., Iwata, N., Okamura, N., Furumoto, S., Kudo, Y., Chang, Q., Saido, T.C., Takashima, A., Lewis, J., Jang, M.-K., Aoki, I., Ito, H., Higuchi, M., 2013. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 79, 1094–1108. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.037>
- Melis, V., Magbagbeolu, M., Rickard, J.E., Horsley, D., Davidson, K., Harrington, K.A., Goatman, K., Goatman, E.A., Deiana, S., Close, S.P., Zabke, C., Stamer, K., Dietze, S., Schwab, K., Storey, J.M.D., Harrington, C.R., Wischik, C.M., Theuring, F., Riedel, G., 2015. Effects of oxidized and reduced forms of methylthioninium in two transgenic mouse tauopathy models. *Behav. Pharmacol.* 26, 353–368. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000133>
- Michel, C.H., Kumar, S., Pinotsi, D., Tunnacliffe, A., St. George-Hyslop, P., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., Kaminski, C.F., Kaminski Schierle, G.S., 2014. Extracellular Monomeric Tau Protein Is Sufficient to Initiate the Spread of Tau Protein Pathology. *J. Biol. Chem.* 289, 956–967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515445>
- Miller, K.R., Koide, A., Leung, B., Fitzsimmons, J., Yoder, B., Yuan, H., Jay, M., Sidhu, S.S., Koide, S., Collins, E.J., 2012. T cell receptor-like recognition of tumor in vivo by synthetic antibody fragment. *PLoS One* 7, e43746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043746>
- Min, S.-W., Chen, X., Tracy, T.E., Li, Y., Zhou, Y., Wang, C., Shirakawa, K., Minami, S.S., Defensor, E., Mok, S.A., Sohn, P.D., Schilling, B., Cong, X., Ellerby, L., Gibson, B.W., Johnson, J., Krogan, N., Shamloo, M., Gestwicki, J., Masliah, E., Verdin, E., Gan, L., 2015. Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nat. Med.* 21, 1154–1162. <https://doi.org/10.1038/nm.3951>
- Min, S.-W., Cho, S.-H., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W.W., Huang, E.J., Shen, Y., Masliah, E., Mukherjee, C., Meyers, D., Cole, P.A., Ott, M., Gan, L., 2010. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron* 67, 953–966. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.044>
- Minchinton, A.I., Tannock, I.F., 2006. Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* 6, 583–592. <https://doi.org/10.1038/nrc1893>
- Mirbaha, H., Chen, D., Morazova, O.A., Ruff, K.M., Sharma, A.M., Liu, X., Goodarzi, M., Pappu, R.V., Colby, D.W., Mirzaei, H., Joachimiak, L.A., Diamond, M.I., 2018. Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *eLife* 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>
- Mitchell, L.S., Colwell, L.J., 2018. Analysis of nanobody paratopes reveals greater diversity than classical antibodies. *Protein Eng. Des. Sel. PEDS*. <https://doi.org/10.1093/protein/gzy017>
- Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., Boehm, J., 2012. Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 287, 32040–32053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>
- Monté, D., Clantin, B., Dewitte, F., Lens, Z., Rucktooa, P., Pardon, E., Steyaert, J., Verger, A., Villeret, V., 2018. Crystal structure of human Mediator subunit MED23. *Nat. Commun.* 9, 3389. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05967-y>
- Morgado, I., Wieligmann, K., Bereza, M., Röncke, R., Meinhardt, K., Annamalai, K., Baumann, M., Wacker, J., Hortschansky, P., Malešević, M., Parthier, C., Mawrin, C., Schiene-Fischer, C., Reymann, K.G., Stubbs, M.T., Balbach, J., Görlach, M., Horn, U., Fändrich,

- M., 2012. Molecular basis of β -amyloid oligomer recognition with a conformational antibody fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 12503–12508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206433109>
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M., Arendash, G.W., 2000. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408, 982–985. <https://doi.org/10.1038/35050116>
- Morris, G.P., Clark, I.A., Vissel, B., 2014. Inconsistencies and Controversies Surrounding the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 2. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0135-5>
- Moutel, S., Bery, N., Bernard, V., Keller, L., Lemesre, E., de Marco, A., Ligat, L., Rain, J.-C., Favre, G., Olichon, A., Perez, F., 2016. NaLi-H1: A universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16228>
- Mudher, A., Colin, M., Dujardin, S., Medina, M., Dewachter, I., Naini, S.M.A., Mandelkow, E.-M., Mandelkow, E., Buée, L., Goedert, M., Brion, J.-P., 2017. What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation? *Acta Neuropathol. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0488-7>
- Mukrasch, M.D., Bibow, S., Korukottu, J., Jeganathan, S., Biernat, J., Griesinger, C., Mandelkow, E., Zweckstetter, M., 2009. Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol.* 7, e34. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>
- Murakami, T., Paitel, E., Kawarabayashi, T., Ikeda, M., Chishti, M.A., Janus, C., Matsubara, E., Sasaki, A., Kawarai, T., Phinney, A.L., Harigaya, Y., Horne, P., Egashira, N., Mishima, K., Hanna, A., Yang, J., Iwasaki, K., Takahashi, M., Fujiwara, M., Ishiguro, K., Bergeron, C., Carlson, G.A., Abe, K., Westaway, D., St George-Hyslop, P., Shoji, M., 2006. Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice: neuronal degeneration, memory disturbance, and phenotypic variation. *Am. J. Pathol.* 169, 1365–1375. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.051250>
- Muruganandam, A., Tanha, J., Narang, S., Stanimirovic, D., 2002. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 240–242. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0343fje>
- Muyldermans, S., 2013. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Muyldermans, S., 2001. Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* 74, 277–302.
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A., Hamers, R., 1994. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* 7, 1129–1135.
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Del Tredici, K., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Haroutunian, V., Hof, P.R., Hulette, C.M., Hyman, B.T., Iwatsubo, T., Jellinger, K.A., Jicha, G.A., Kövari, E., Kukull, W.A., Leverenz, J.B., Love, S., Mackenzie, I.R., Mann, D.M., Masliah, E., McKee, A.C., Montine, T.J., Morris, J.C., Schneider, J.A., Sonnen, J.A., Thal, D.R., Trojanowski, J.Q., Troncoso, J.C., Wisniewski, T., Woltjer, R.L., Beach, T.G., 2012. Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381. <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 Res.* 387, 271–280.
- Nguyen, V.K., Hamers, R., Wyns, L., Muyldermans, S., 2000. Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J.* 19, 921–930. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.921>
- Nguyen, V.K., Su, C., Muyldermans, S., van der Loo, W., 2002. Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation. *Immunogenetics* 54, 39–47. <https://doi.org/10.1007/s00251-002-0433-0>
- Noble, W., Hanger, D.P., Miller, C.C.J., Lovestone, S., 2013. The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00083>
- Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D., Duff, K., 2005. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 6990–6995. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500466102>
- Nobuhara, C.K., DeVos, S.L., Commins, C., Wegmann, S., Moore, B.D., Roe, A.D., Costantino, I., Frosch, M.P., Pitstick, R., Carlson, G.A., Hock, C., Nitsch, R.M., Montrasio, F., Grimm, J., Cheung, A.E., Dunah, A.W., Wittmann, M., Bussiere, T., Weinreb, P.H., Hyman, B.T., Takeda, S., 2017. Tau Antibody-Targeting Pathological Species Block Neuronal Uptake and Interneuron Propagation of Tau in Vitro. *Am. J. Pathol.* <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.01.022>
- Novak, M., Kabat, J., Wischik, C.M., 1993. Molecular characterization of the minimal protease resistant tau unit of the Alzheimer's disease paired helical filament. *EMBO J.* 12, 365–370.
- Nunes, M.A., Viel, T.A., Buck, H.S., 2013. Microdose lithium treatment stabilized cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 10, 104–107.
- Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D.H., LaFerla, F.M., 2006. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J. Biol. Chem.* 281, 39413–39423. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608485200>
- Ohnishi, H., Murata, Y., Okazawa, H., Matozaki, T., 2011. Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. *Trends Neurosci.* 34, 629–637. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.09.005>
- Oldham, R.K., Dillman, R.O., 2008. Monoclonal antibodies in cancer therapy: 25 years of progress. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 1774–1777. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.7438>
- Orgogozo, J.-M., Gilman, S., Dartigues, J.-F., Laurent, B., Puel, M., Kirby, L.C., Jouanny, P., Dubois, B., Eisner, L., Flitman, S., Michel, B.F., Boada, M., Frank, A., Hock, C., 2003. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61, 46–54.
- Pain, C., Dumont, J., Dumoulin, M., 2015. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. *Biochimie* 111, 82–106. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.01.012>
- Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S.G.F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W.G.J., Kobilka, B.K., Steyaert, J., 2014. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nat. Protoc.* 9, 674–693. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.039>
- Park, Y.-J., Pardon, E., Wu, M., Steyaert, J., Hol, W.G.J., 2012. Crystal structure of a heterodimer of editosome interaction proteins in complex with two copies of a

- cross-reacting nanobody. *Nucleic Acids Res.* 40, 1828–1840.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr867>
- Parvathy, S., Karran, E.H., Turner, A.J., Hooper, N.M., 1998. The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor-alpha convertase. *FEBS Lett.* 431, 63–65.
- Patterson, K.R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N.M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J.F., Philibert, K., Glucksman, M.J., Binder, L.I., 2011. Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286, 23063–23076.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237974>
- Pearson, H.A., Peers, C., 2006. Physiological roles for amyloid β peptides. *J. Physiol.* 575, 5–10. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111203>
- Pennanen, L., Wolfer, D.P., Nitsch, R.M., Götz, J., 2006. Impaired spatial reference memory and increased exploratory behavior in P301L tau transgenic mice. *Genes Brain Behav.* 5, 369–379. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00165.x>
- Plant, L.D., Boyle, J.P., Smith, I.F., Peers, C., Pearson, H.A., 2003. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 5531–5535.
- Prince, M.J., Commas-Herrera, A., Knapp, M., Guerchet, M., Karagiannidou, M., 2016. World Alzheimer Report 2016 - Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future [WWW Document]. URL <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016> (accessed 6.22.18).
- Prusiner, S.B., 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278, 245–251.
- Prusiner, S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136–144.
- Qi, H., Cantrelle, F.-X., Benhelli-Mokrani, H., Smet-Nocca, C., Buée, L., Lippens, G., Bonnefoy, E., Galas, M.-C., Landrieu, I., 2015. Nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of interaction of Tau with DNA and its regulation by phosphorylation. *Biochemistry* 54, 1525–1533. <https://doi.org/10.1021/bi5014613>
- Qi, H., Prabakaran, S., Cantrelle, F.-X., Chambrud, B., Gunawardena, J., Lippens, G., Landrieu, I., 2016. Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase. *J. Biol. Chem.* 291, 7742–7753.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.700914>
- Rasmussen, Søren G. F., Choi, H.-J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., DeVree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R.K., Gellman, S.H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W.I., Kobilka, B.K., 2011. Structure of a nanobody-stabilized active state of the β 2 adrenoceptor. *Nature* 469, 175–180.
<https://doi.org/10.1038/nature09648>
- Rasmussen, Søren G.F., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T.A., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., Kobilka, B.K., 2011. Crystal Structure of the β 2Adrenergic Receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549–555. <https://doi.org/10.1038/nature10361>
- Reyes, J.F., Geula, C., Vana, L., Binder, L.I., 2012. Selective tau tyrosine nitration in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 119–132.
<https://doi.org/10.1007/s00401-011-0898-8>
- Rissman, R.A., Poon, W.W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M.P., LaFerla, F.M., Rohn, T.T., Cotman, C.W., 2004. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J. Clin. Invest.* 114, 121–130.
<https://doi.org/10.1172/JCI200420640>

- Rohan de Silva, H.A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L.S., Wilkinson, S.L., Patel, A.J., 1997. Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 47, 147–156.
- Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E.C., Brown, C.J., Dunker, A.K., 2001. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* 42, 38–48.
- Roovers, R.C., Vosjan, M.J.W.D., Laeremans, T., el Khoulati, R., de Bruin, R.C.G., Ferguson, K.M., Verkleij, A.J., van Dongen, G.A.M.S., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., 2011. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int. J. Cancer* 129, 2013–2024. <https://doi.org/10.1002/ijc.26145>
- Roux, K.H., Greenberg, A.S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E.C., Flajnik, M.F., 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11804–11809. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11804>
- Rutgers, K.S., Nabuurs, R.J.A., van den Berg, S. a. A., Schenk, G.J., Rotman, M., Verrips, C.T., van Duinen, S.G., Maat-Schieman, M.L., van Buchem, M.A., de Boer, A.G., van der Maarel, S.M., 2011. Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the in vitro blood-brain barrier. *Neuroscience* 190, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.076>
- Saerens, D., Pellis, M., Loris, R., Pardon, E., Dumoulin, M., Matagne, A., Wyns, L., Muyldermans, S., Conrath, K., 2005. Identification of a universal VHH framework to graft non-canonical antigen-binding loops of camel single-domain antibodies. *J. Mol. Biol.* 352, 597–607. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.038>
- Saito, Y., Ruberu, N.N., Sawabe, M., Arai, T., Tanaka, N., Kakuta, Y., Yamanouchi, H., Murayama, S., 2004. Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 911–918.
- Salloway, S., Sperling, R., Fox, N.C., Blennow, K., Klunk, W., Raskind, M., Sabbagh, M., Honig, L.S., Porsteinsson, A.P., Ferris, S., Reichert, M., Ketter, N., Nejadnik, B., Guenzler, V., Miloslavsky, M., Wang, D., Lu, Y., Lull, J., Tudor, I.C., Liu, E., Grundman, M., Yuen, E., Black, R., Brashear, H.R., Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators, 2014. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer’s disease. *N. Engl. J. Med.* 370, 322–333. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304839>
- Saman, S., Kim, W., Raya, M., Visnick, Y., Miro, S., Saman, S., Sarmad, J., Jackson, B., McKee, A.C., Alvarez, V.E., Lee, N.C.Y., Hall, G.F., 2012. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 287, 3842–3849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277061>
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P., 1999. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177. <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. *Am. J. Pathol.* 169, 599–616. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060002>
- Schwarz, A.J., Yu, P., Miller, B.B., Shcherbinin, S., Dickson, J., Navitsky, M., Joshi, A.D., Devous, M.D., Mintun, M.S., 2016. Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages. *Brain J. Neurol.* 139, 1539–1550. <https://doi.org/10.1093/brain/aww023>

- Seidler, P.M., Boyer, D.R., Rodriguez, J.A., Sawaya, M.R., Cascio, D., Murray, K., Gonen, T., Eisenberg, D.S., 2018. Structure-based inhibitors of tau aggregation. *Nat. Chem.* 10, 170–176. <https://doi.org/10.1038/nchem.2889>
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1998. Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 299–309. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0813>
- Serenó, L., Coma, M., Rodríguez, M., Sánchez-Ferrer, P., Sánchez, M.B., Gich, I., Agulló, J.M., Pérez, M., Avila, J., Guardia-Laguarta, C., Clarimón, J., Lleó, A., Gómez-Isla, T., 2009. A novel GSK-3 β inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol. Dis.* 35, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.025>
- Sergeant, N., Wattez, A., Delacourte, A., 1999. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms. *J. Neurochem.* 72, 1243–1249.
- Shinozaki, N., Hashimoto, R., Fukui, K., Uchiyama, S., 2017. Efficient generation of single domain antibodies with high affinities and enhanced thermal stabilities. *Sci. Rep.* 7, 5794. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06277-x>
- Sibille, N., Sillen, A., Leroy, A., Wieruszeski, J.-M., Mulloy, B., Landrieu, I., Lippens, G., 2006. Structural impact of heparin binding to full-length Tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 45, 12560–12572. <https://doi.org/10.1021/bi060964o>
- Sillen, A., Barbier, P., Landrieu, I., Lefebvre, S., Wieruszeski, J.-M., Leroy, A., Peyrot, V., Lippens, G., 2007. NMR investigation of the interaction between the neuronal protein tau and the microtubules. *Biochemistry* 46, 3055–3064. <https://doi.org/10.1021/bi061920i>
- Sontag, E., Luangpirom, A., Hladik, C., Mudrak, I., Ogris, E., Speciale, S., White, C.L., 2004. Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 287–301.
- Spencer, B., Brüsweiler, S., Sealey-Cardona, M., Rockenstein, E., Adame, A., Florio, J., Mante, M., Trinh, I., Rissman, R.A., Konrat, R., Masliah, E., 2018. Selective targeting of 3 repeat Tau with brain penetrating single chain antibodies for the treatment of neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 136, 69–87. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1869-0>
- Spillantini, M. G., Bird, T.D., Ghetti, B., 1998. Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 8, 387–402.
- Spillantini, Maria Grazia, Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., Ghetti, B., 1998. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7737–7741.
- Steyaert, J., Kobilka, B.K., 2011. Nanobody stabilization of G protein-coupled receptor conformational states. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 567–572. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2011.06.011>
- Stopschinski, B.E., Holmes, B.B., Miller, G.M., Manon, V.A., Vaquer-Alicea, J., Prueitt, W.L., Hsieh-Wilson, L.C., Diamond, M.I., 2018. Specific glycosaminoglycan chain length and sulfation patterns are required for cell uptake of tau versus α -synuclein and β -amyloid aggregates. *J. Biol. Chem.* 293, 10826–10840. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000378>
- Su, Y., Ryder, J., Li, B., Wu, X., Fox, N., Solenberg, P., Brune, K., Paul, S., Zhou, Y., Liu, F., Ni, B., 2004. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry* 43, 6899–6908. <https://doi.org/10.1021/bi035627j>

- Subramanian, S., Savanur, G., Madhavadas, S., 2016. Passive immunization targeting the N-terminal region of phosphorylated tau (residues 68-71) improves spatial memory in okadaic acid induced tauopathy model rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.101>
- Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buée, L., Galas, M.-C., 2011. Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *J. Biol. Chem.* 286, 4566–4575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>
- Tardivel, M., Bégard, S., Bousset, L., Dujardin, S., Coens, A., Melki, R., Buée, L., Colin, M., 2016. Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol. Commun.* 4. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>
- Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., Iwatsubo, T., 1997. Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* 8, 2797–2801.
- Tepper, K., Biernat, J., Kumar, S., Wegmann, S., Timm, T., Hübschmann, S., Redecke, L., Mandelkow, E.-M., Müller, D.J., Mandelkow, E., 2014. Oligomer Formation of Tau Protein Hyperphosphorylated in Cells. *J. Biol. Chem.* 289, 34389–34407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.611368>
- Teune, L.K., Bartels, A.L., de Jong, B.M., Willemsen, A.T.M., Eshuis, S.A., de Vries, J.J., van Oostrom, J.C.H., Leenders, K.L., 2010. Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* 25, 2395–2404. <https://doi.org/10.1002/mds.23291>
- Tompa, P., 2002. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27, 527–533.
- Trepanier, C.H., Jackson, M.F., MacDonald, J.F., 2012. Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *FEBS J.* 279, 12–19. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08391.x>
- Troquier, L., Caillierez, R., Burnouf, S., Fernandez-Gomez, F.J., Grosjean, M.-E., Zommer, N., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Blum, D., Buee, L., 2012. Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 397–405.
- van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D.T., Kim, P.M., Kriwacki, R.W., Oldfield, C.J., Pappu, R.V., Tompa, P., Uversky, V.N., Wright, P.E., Babu, M.M., 2014. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* 114, 6589–6631. <https://doi.org/10.1021/cr400525m>
- van der Linden, R., de Geus, B., Stok, W., Bos, W., van Wassenaar, D., Verrips, T., Frenken, L., 2000. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J. Immunol. Methods* 240, 185–195.
- van der Linden, R.H., Frenken, L.G., de Geus, B., Harmsen, M.M., Ruuls, R.C., Stok, W., de Ron, L., Wilson, S., Davis, P., Verrips, C.T., 1999. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1431, 37–46.
- van der Meel, R., Oliveira, S., Altintas, I., Haselberg, R., van der Veecken, J., Roovers, R.C., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Storm, G., Hennink, W.E., Schiffelers, R.M., Kok, R.J., 2012. Tumor-targeted Nanobullets: Anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 159, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.027>
- van der Meel, R., Oliveira, S., Altintas, I., Heukers, R., Pieters, E.H.E., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Storm, G., Hennink, W.E., Kok, R.J., Schiffelers, R.M., 2013. Inhibition of tumor growth by targeted anti-EGFR/IGF-1R nanobullets depends on

- efficient blocking of cell survival pathways. *Mol. Pharm.* 10, 3717–3727.
<https://doi.org/10.1021/mp400212v>
- van der Veecken, J., Oliveira, S., Schiffelers, R.M., Storm, G., van Bergen En Henegouwen, P.M.P., Roovers, R.C., 2009. Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 9, 748–760.
- van Eersel, J., Ke, Y.D., Liu, X., Delerue, F., Kril, J.J., Götz, J., Ittner, L.M., 2010. Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13888–13893.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1009038107>
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M., 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.
- Vechterova, L., Kontsekova, E., Zilka, N., Ferencik, M., Ravid, R., Novak, M., 2003. DC11: a novel monoclonal antibody revealing Alzheimer's disease-specific tau epitope. *Neuroreport* 14, 87–91. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000053064.88427.50>
- Vincke, C., Gutiérrez, C., Wernery, U., Devoogdt, N., Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Muyldermans, S., 2012. Generation of single domain antibody fragments derived from camelids and generation of manifold constructs. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 907, 145–176. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_8
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nesslany, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., Buée, L., Galas, M.-C., 2014. A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
<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. *J. Biol. Chem.* 276, 48165–48174. <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 ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5129–5134.
- Vu, K.B., Ghahroudi, M.A., Wyns, L., Muyldermans, S., 1997. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol. Immunol.* 34, 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(97\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(97)00146-6)
- Wan, R., Liu, A., Hou, X., Lai, Z., Li, J., Yang, N., Tan, J., Mo, F., Hu, Z., Yang, X., Zhao, Y., Lu, X., 2018. Screening and antitumor effect of an anti-CTLA-4 nanobody. *Oncol. Rep.* 39, 511–518. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6131>
- Wang, A.C., Jensen, E.H., Rexach, J.E., Vinters, H.V., Hsieh-Wilson, L.C., 2016. Loss of O-GlcNAc glycosylation in forebrain excitatory neurons induces neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 15120–15125.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1606899113>
- Wang, H., Megill, A., He, K., Kirkwood, A., Lee, H.-K., 2012. Consequences of Inhibiting Amyloid Precursor Protein Processing Enzymes on Synaptic Function and Plasticity. *Neural Plast.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/272374>

- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1996. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2, 871–875.
- Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., 2017. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol. Neurodegener.* 12, 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>
- Wang, Y., Mandelkow, E., 2016. Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>
- Watanabe, A., Hong, W.-K., Dohmae, N., Takio, K., Morishima-Kawashima, M., Ihara, Y., 2004. Molecular aging of tau: disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 90, 1302–1311. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02611.x>
- Wegmann, S., Eftekharzadeh, B., Tepper, K., Zoltowska, K.M., Bennett, R.E., Dujardin, S., Laskowski, P.R., MacKenzie, D., Kamath, T., Commins, C., Vanderburg, C., Roe, A.D., Fan, Z., Molliex, A.M., Hernandez-Vega, A., Muller, D., Hyman, A.A., Mandelkow, E., Taylor, J.P., Hyman, B.T., 2018. Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate tau aggregation. *EMBO J.* <https://doi.org/10.15252/embj.201798049>
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1858–1862.
- Wille, H., Drewes, G., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 1992. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J. Cell Biol.* 118, 573–584.
- Wilson, D.M., Binder, L.I., 1997. Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 2181–2195.
- Wischik, C.M., Edwards, P.C., Lai, R.Y., Roth, M., Harrington, C.R., 1996. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11213–11218.
- Wischik, C.M., Novak, M., Thøgersen, H.C., Edwards, P.C., Runswick, M.J., Jakes, R., Walker, J.E., Milstein, C., Roth, M., Klug, A., 1988. Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 4506–4510.
- Wu, T.T., Johnson, G., Kabat, E.A., 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16, 1–7. <https://doi.org/10.1002/prot.340160102>
- Xu, H., Rösler, T.W., Carlsson, T., de Andrade, A., Fiala, O., Hollerhage, M., Oertel, W.H., Goedert, M., Aigner, A., Höglinger, G.U., 2014. Tau silencing by siRNA in the P301S mouse model of tauopathy. *Curr. Gene Ther.* 14, 343–351.
- Yu, F., Zhang, Y., Chuang, D.-M., 2012. Lithium reduces BACE1 overexpression, β amyloid accumulation, and spatial learning deficits in mice with traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 29, 2342–2351. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2449>
- Yu, J.-Z., Rasenick, M.M., 2006. Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1452–1461. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5206com>
- Yuzwa, S.A., Cheung, A.H., Okon, M., McIntosh, L.P., Vocadlo, D.J., 2014. O-GlcNAc modification of tau directly inhibits its aggregation without perturbing the conformational properties of tau monomers. *J. Mol. Biol.* 426, 1736–1752. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.01.004>
- Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., López García, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., Wüthrich, K., 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 145–150.

- Zempel, H., Mandelkow, E.-M., 2015. Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia. *Mol. Neurodegener.* 10. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0064-1>
- Zhao, H., Cui, K., Muschenborn, A., Wong, S.T.C., 2008. Progress of engineered antibody-targeted molecular imaging for solid tumors (Review). *Mol. Med. Rep.* 1, 131–134.
- Zheng, W.-H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W., Kar, S., 2002. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 115, 201–211.
- Zilka, N., Filipcik, P., Koson, P., Fialova, L., Skrabana, R., Zilkova, M., Rolkova, G., Kontseikova, E., Novak, M., 2006. Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration in vivo. *FEBS Lett.* 580, 3582–3588. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.05.029>

Publications

Clément Danis*, Elian Dupré*, Marie Albert, Alexis Arrial, François-Xavier Cantrelle, Sabiha Eddarkaoui, Anne Loyens, Séverine Bégard, Raphaëlle Caillierez, Hamida Merzougui, Jean-Christophe Rain, Morvane Colin, Xavier Hanouille, Luc Buée, Isabelle Landrieu. Inhibition of Tau aggregation by targeting its nucleation core with a camelid heavy-chain-only antibody. (en cours, p114)

Marie Albert*, Kevin Carvalho*, **Clément Danis***, Manon Domise*, Caroline Evrard*, Melissa Gilles*, Victoria Gomez-Murcia*, Mégane Homa*, Coline Leghay*, Claudia Marinangeli*, Claire Schirmer*, Khalid Iqbal, Luc Buee. Tau as a therapeutic target. *Review* (en cours, en annexe p205-p260)

Clément Danis, Elian Dupré, Xavier Hanouille, Isabelle Landrieu*, Alessia Lasorsa, João Filipe Neves, Robert Schneider, Caroline Smet-Nocca. Nuclear magnetic resonance spectroscopy insights into Tau structure in solution: Impact of post-translational modifications. *Chapitre de Tau biology* (en cours)

Marie Albert*, Georges Mairet-Coello*, **Clément Danis**, Sarah Lieger, Raphaëlle Caillierez, Sébastien Carrier, Emilie Skrobala, Isabelle Landrieu, Anne Michel, Mathieu Schmitt, Martin Citron, Patrick Downey, Jean-Philippe Courade, Luc Buée and Morvane Colin. Prevention of tau seeding and propagation by passive immunotherapy with a central tau epitope antibody. *Brain* (en révision)

Clément Danis*, Clément Despres*, Luiza M. Bessa, Idir Malki, Hamida Merzougui, Isabelle Huvent, Haoling Qi, Guy Lippens, François-Xavier Cantrelle, Robert Schneider, Xavier Hanouille, Caroline Smet-Nocca, Isabelle Landrieu. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of Multiple Phosphorylations of Intrinsically Disordered Proteins. *J. Vis. Exp* (2016) (en annexe p261)

Formations/Communications

Formation pratique en RMN du liquide et solide

Lille 14-18 Mars 2016

Scientific Advisory Board Laboratoire d'Excellence DISTALZ (présentation orale)

Lille 21-22 Juin 2016

Conférence Jacques Monod (présentation orale):

Méplissement des protéines – Vers une agrégation toxique des protéines au cours du vieillissement et des maladies liées à l'âge : de la structure à la pathologie et sa propagation

Roscoff 12-16 septembre 2016

Workshop COST NGP-net Marseille Winter School

Experimental Methods for Protein Disorder and Aggregation

Marseille 13-17 février 2017

International Workshop Distalz (poster)

Inhibition of Protein-Protein Interactions in Alzheimer's Disease and Related Proteinopathies

Lille 27-28 Mars 2017

EuroTau (poster)

Lille 27-28 Avril 2017

VIB Conference : Next-Generation Antibodies and Protein Analysis (poster)

Next-generation antibodies and protein analysis

Gand 16-17 octobre 2017

EuroTau (poster)

Lille 26-27 Avril 2018

Société française des neurosciences : Advances in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders 3ème journées Thématiques (poster)

Strasbourg 7-8 juin 2018

AUEC MA² : Attestation Universitaire d'Enseignement Complémentaire

Diagnostic et prise en charge – Maladie d'Alzheimer et maladies apparentées

Lille 2017-2018

Annexes

TAU AS A THERAPEUTIC TARGET

Marie Albert*, Kevin Carvalho*, Clément Danis*, Manon Domise*, Caroline Evrard*, Melissa Gilles*, Victoria Gomez-Murcia*, Mégane Homa*, Coline Leghay*, Claudia Marinangeli*, Claire Schirmer*, Khalid Iqbal¹, Luc Buee

University of Lille, Inserm, CHU-Lille, UMR-S 1172, Alzheimer & Tauopathies, LabEx DISTALZ, F-59000 Lille, France

*equal contribution

¹Current address: Department of Neurochemistry, Inge Grundke-Iqbal Research Floor, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, New York 10314, USA; email: khalid.iqbal.ibr@gmail.com

Address all correspondence to: Prof. Dr. Luc Buee

Head of the team Alzheimer & Tauopathies

Director of the Jean-Pierre Aubert research centre (JPArc - UMR-S 1172)

Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille

Faculté de Médecine - Pôle Recherche

59045 Lille France

Abstract

Tau pathology is a hallmark of Alzheimer's disease and a family of related conditions called Tauopathies. The density of Tau lesions which, without fail, are made up of abnormally hyperphosphorylated protein directly correlates with the degree of cognitive impairment and preclinical studies have shown the therapeutic potential of targeting Tau pathology in experimental animal models. Currently, there is an increasing interest both in academia and in industry to understand Tau-based mechanisms and therapeutic strategies. Tau is the major microtubule associated protein of a normal neuron where it promotes the assembly of tubulin into microtubules and maintains their structure. In addition to the cell cytoplasm Tau is also known to exist in various cellular compartments where it is involved in different functions. This article reviews various functions of Tau beyond microtubule assembly, its role in Tau pathology in Alzheimer's disease and related conditions, the seeding and the spread of Tau pathology and its potential as a therapeutic target. Also included in this article are current Tau immunotherapy approaches and human clinical trials and a discussion of the merits of active and passive Tau immunotherapies.

Introduction

Alzheimer's Disease

Epidemiology

Cerebral aging is a major public health problem in modern society. With improvement in modern medicine, especially increasing use of preventive care, the life span continues to increase. However, aging is the main risk factor for dementia and since life expectancy increases, the number of people with dementia is rising. Alzheimer's disease (AD) is the biggest single cause of dementia in the elderly. At age 65, around 3% of people suffers from AD and this prevalence doubles every five years thereafter, reaching almost 50% at age 85. Alzheimer's Disease International estimates that there were 46.8 million people worldwide living with dementia in 2015 and this number will reach 131.5 million in 2050, unless a treatment to prevent, inhibit or cure this disease is found (Prince et al. 2016). The magnitude of this problem has also created an enormous economic burden to the society. The total estimated worldwide cost of dementia is US\$818 billion, and it will become a trillion dollars disease by 2018.

Histopathology

AD is neuropathologically characterized by the extracellular deposition of beta amyloid in the brain parenchyma and in the cerebral blood vessels and by intraneuronal accumulation of paired helical filaments in neuronal cell body as neurofibrillary tangles, in neurites as neuropil threads and in dystrophic neurites that surround the amyloid plaque core. The density of the neurofibrillary pathology but not the beta amyloid correlates with the clinical phenotype of the dementia (Alafuzoff et al. 1987; Grundke-Iqbal et al. 1986; Arriagada et al. 1992). This has been recently confirmed with PET Tau tracers (Maass et al. 2017). In fact, ~30% of normal aged

people have as many beta amyloid plaques in their brains as in typical cases of AD. The plaques in normal aged cases lack the dystrophic neurites with neurofibrillary pathology surrounding the beta amyloid plaque core.

AD paired helical filaments are made up of microtubule associated protein Tau (Brion et al. 1985; Delacourte and Defossez 1986) in an abnormally hyperphosphorylated state (Grundke-Iqbal et al. 1986). Tau protein is encoded by a single gene MAPT which lies in chromosome 17. Tau protein is expressed in mature human brain in six isoforms generated by alternative splicing of its pre-mRNA (M. Goedert et al. 1989). These six isoforms are generated by splicing of exon 10 that codes for microtubule binding repeat (R) 2 and exons 2 and 3 which code for amino-terminal inserts 1 and 2, respectively. In normal human brain the 3R and 4R Tau occur in 1:1 ratio.

Tau Pathology

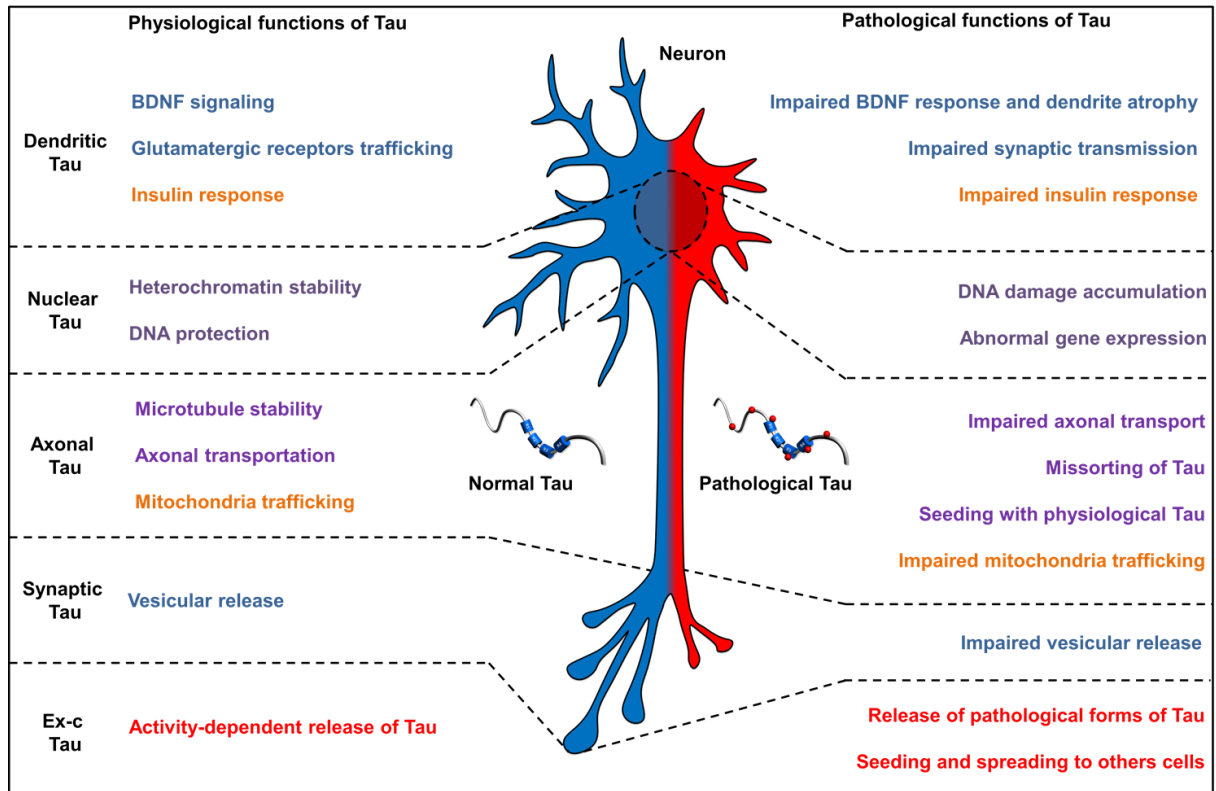
Tau pathology, which in addition to AD, is a hallmark of a family of neurodegenerative diseases, called Tauopathies is, without any exception, made up of the hyperphosphorylated protein (Grundke-Iqbal et al. 1986). Unlike in AD and adults with Down's syndrome, which are characterized by the presence of both beta amyloid plaques and neurofibrillary tangles, Tauopathies [which include fronto-temporal lobar degeneration (Maria Grazia Spillantini et al. 1998), primary age-related Tauopathy, PART (Crary et al. 2014; Charles Duyckaerts et al. 2015), progressive supranuclear palsy (Boxer et al. 2017), corticobasal degeneration, Pick's disease (Buée Scherrer et al. 1996), argyrophilic grain disease, postencephalitic parkinsonism (Hof et al. 1992; Buée-Scherrer et al. 1997) and Guam Parkinsonism dementia complex] (Hof et al. 1994; Buée-Scherrer et al. 1995) show Tau pathology in the absence of beta amyloid pathology. In fact, in some Tauopathies this ratio is altered, e.g. while progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration are mostly 4R Tauopathies (N.

Sergeant, Watzek, and Delacourte 1999), Pick's bodies are made of only 3R Tau in Pick's disease (Buée Scherrer et al. 1996). Mutations in Tau gene that alter the 1:1 ratio of 3R and 4R cause Tauopathy. Several missense mutations in MAPT/Tau cause fronto-temporal lobar degeneration (M. G. Spillantini, Bird, and Ghetti 1998; Maria Grazia Spillantini et al. 1998). Independent of the etiology whether disease is caused by a Tau mutation as in familial cases of Tauopathies or no Tau mutation as in AD, Tau pathology is made up of the hyperphosphorylated protein. Thus, Tau pathology can be both primary as in familial cases of fronto-temporal lobar degeneration and secondary as in AD. However, in both cases Tau pathology is strongly linked to cognitive impairment and hence a potential therapeutic target. Mechanisms of Tau pathology, especially involving hyperphosphorylation and truncation of Tau have been the subject of several recent review articles (Maria Grazia Spillantini and Goedert 2013; Khalid Iqbal, Liu, and Gong 2016; Y. Wang and Mandelkow 2016; Holtzman et al. 2016). In this article, we review various functions of Tau that could be compromised in AD and related Tauopathies, possible therapeutic strategies and their pros and cons, especially of Tau immunotherapy which is at present a major focus of the field.

Various functions of Tau

Tau is now well known as a microtubule-associated protein in neurons (Weingarten et al. 1975; Cleveland, Hwo, and Kirschner 1977; Drechsel et al. 1992; Trinczek et al. 1995). However, Tau presents various functions, depending on its localization inside and outside neurons, and these functions are altered under pathophysiological states (Figure 1). Tau is widely subject to post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation, methylation, isomerization, glycation, nitration, ubiquitination, sumoylation, O-N- acetyl-gluco-aminylation (O-Glc-Nac) and

truncation. Some of them, for instance truncation, glycation and polyamination exist under pathological states only while others, such as hyperphosphorylation, glycosylation and nitration, which are fundamental for physiological functions of Tau, are deregulated in Tauopathies. In fact, in Tauopathies, Tau proteins are hyper and abnormally phosphorylated, and could have role in their aggregation (A. Alonso et al. 2001; F. Liu et al. 2007). These modifications induce changes of Tau functions. Indeed, it leads to somatodendritic relocalization of Tau (Tashiro et al. 1997; X. Li et al. 2011), destabilization of microtubule network (A. C. Alonso et al. 1994; B. Li et al. 2007), axonal transport deficits (Cuchillo-Ibanez et al. 2008) and breakdown of neuronal polarity (X. Li et al. 2011). Synaptic dysfunctions are also identified as axonal transport deficits, perturbations of recruitments of mitochondria to synapses, synapse depotentiation and spine collapse (Spires-Jones and Hyman 2014). Tau deficiency alters synaptic plasticity, suggesting its potential role in memory mechanism (Ahmed et al. 2014).



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

Figure 1 : Various functions of Tau. Besides stabilization of microtubules, Tau is implicated in following functions: synaptic activity (signalling pathways, synaptic transmission, vesicular release), nuclear stability (DNA protection and heterochromatin stability), metabolism (insulin response and mitochondria trafficking) and extracellular functions still to be uncovered. In pathological conditions, there is an alteration of these functions that could explain many of the deficits observed in human Tauopathies and their animal models.

Tau as cytosolic MAP

Microtubule Associated Protein (MAP) Tau was first identified from porcine brain extracts as an essential factor for assembling microtubules in 1975 (Weingarten et al. 1975; Witman et al. 1976). It is interesting to note that Tau was isolated from Alzheimer neurofibrillary tangles as a PHF protein in 1974 (K. Iqbal et al. 1974) and it was not till 1986 it was shown that the PHF protein and the microtubule associated protein Tau were one and the same (Grundke-Iqbal et al. 1986).

Microtubules are present in all cell types but are described as being particularly stable in neurons (Seitz-Tutter, Langford, and Weiss 1988). In fact, neurons are highly differentiated cells and microtubules are critical to the axon as they are required for axoplasmic transport; microtubules enable axons to retract and expand to create neural circuits (K. M. Yamada, Spooner, and Wessells 1970). Tau can bind to the outside (Santarella et al. 2004), and inside of microtubules (Kar et al. 2003). This ability to bind microtubules depends on the C-terminal region of Tau named Microtubule Binding Domain (MBD) (Gustke et al. 1994). This region contains three (3R isoforms) or four (4R isoforms) repeating units named R1, R2, R3 and R4 corresponding to highly conserved sequences of the MAP (M. Goedert et al. 1989). These motifs are directly involved in the Tau binding to microtubules (Goode et al. 1997; Kolarova et al. 2012) and separated by inter-repeats, iR1, iR2 and iR3, which also play a role in microtubule binding affinity (Goode and Feinstein, J. Cell. Biol., 1994). In fact, it has been shown that the absence of iR1 decreases the affinity of Tau for microtubules. Probably because of an extra iR, the 4R isoforms show a greater affinity for microtubules than the 3R isoforms (Panda et al. 2003). This binding mechanism remains unclear but the studies show ionic binding, the repeating units are positively charged whereas the microtubules are negatively charged (Jho et al. 2010; Kadavath et al. 2015). Because, the N-terminal part of Tau is charged negatively, it's not able to bind microtubules but it's involved in the spacing between microtubules (Frappier et al. 1994) and consequently regulates the axonal diameter (Boyne et al. 1995).

Numerous *in vitro* and in cells mechanistic studies have shown that Tau increases the rate of microtubule polymerization (Witman et al. 1976). Indeed, the length of polymerization of an isolated microtubule is nine times higher when Tau is present

(Drechsel et al. 1992). Thus, Tau protein is directly involved in the microtubular dynamic and a deregulation leads to various cellular consequences. Cleveland's work in 1977 shows that Tau may be phosphorylated (Cleveland, Hwo, and Kirschner 1977) and the phosphorylation can play a role in Tau functions notably in the microtubule dynamic. Early studies have shown that in its non-hyperphosphorylated form, Tau promotes polymerization of tubulin into microtubules better than when it is hyperphosphorylated (Lindwall and Cole 1984; A. C. Alonso et al. 1994). Subsequently, Tau phosphorylation sites involved in microtubule binding could be identified. Indeed, the phosphorylation of Ser262, Ser293, Ser324 and Ser356 residues located in the repeat units results in inhibition of the Tau binding to microtubules (Biernat et al. 1993; Drewes et al. 1995, 1997; Fischer et al. 2009). Thr231 and Ser235 residues located in the proline rich domain, which when phosphorylated result in a decrease in Tau affinity for microtubules (Sengupta et al. 1998; Hamdane et al. 2003; Cho and Johnson 2004). Indeed, phosphorylation neutralizes the positive charge of C-terminal part of Tau, alters the conformation and leads to the detachment of Tau from microtubules. In pathological conditions as in Tauopathies, the association of Tau with microtubules is disrupted because Tau is abnormally hyperphosphorylated (Grundke-Iqbal et al. 1986; K. Iqbal et al. 1986; Jho et al. 2010).

Tau as a nuclear protein

Since almost thirty years, Tau protein is also known to localise in nucleus where it plays many unclear roles (Metuzals et al. 1988; Loomis et al. 1990). Nuclear Tau protein has been reported in a large variety of cells including neuronal and non-neuronal cells in rodent or primate cell lines and also in mouse and human brains

(Maina, Al-Hilaly, and Serpell 2016). The major Tau isoform which localises in the nucleus is 1N4R although other Tau isoforms are also present (C. Liu and Götz 2013). Nuclear Tau is essentially non-phosphorylated but the existence of both phosphorylated and non-phosphorylated Tau has been reported in the nucleus (Guo, Noble, and Hanger 2017). After hyperthermic stress, cytoplasmic dephosphorylated Tau translocates to the nucleus suggesting that Tau phosphorylation state could mediate its shuttling between these two compartments (A. D. Alonso et al. 2010; Sultan et al. 2011). Tau is also located in the nucleolus where it is involved in the processing of ribosomal RNA. Indeed, a loss of Tau induces a decrease of ribosomal RNA synthesis and also affects ribosomal DNA stability (Bou Samra et al. 2017).

In vitro studies have shown that purified Tau can bind nuclear DNA (Hua and He 2003; Y. Wei et al. 2008). The protein domains involved in the interaction between Tau and DNA have been characterized in several studies and shown that Tau binds to the AT-rich minor groove of DNA through its proline-rich and microtubule binding domains (Qi et al. 2015; Rossi et al. 2013). Other studies demonstrate that Tau specifically binds to, AT-rich pericentromeric satellite DNA sequences (Sjoberg 2006). Tau displays many phosphorylated sites in this location and reports indicate that Tau-DNA interaction is strongly reduced when Tau is phosphorylated (Qi et al. 2015). Studies performed in Tau-deficient mice (KO-Tau) have revealed that Tau plays a major role in DNA and RNA protection under physiological and hyperthermic conditions (Sultan et al. 2011; Violet et al. 2014). Interestingly, hyperphosphorylation of Tau prevents its protecting effect of DNA from damages in N2A cell lines (Lu et al. 2013) and in the brain of a mouse model of Tauopathies (Thy-Tau22). In this Thy-Tau22 mouse model, hyperthermia-induced Tau oligomers correlate with accumulation of nucleic acid damage. It seems that Tau oligomerization process

prevents DNA protective function of soluble Tau monomers (Violet et al. 2015). A recent study in HEK293 cells has demonstrated that hyperphosphorylation of nuclear Tau at Thr205 activates the Ca²⁺/CaMKIV pathway which aggravates, in turn, Tau phosphorylation and thus leads to neurodegeneration (Y. P. Wei et al. 2018).

The involvement of nuclear Tau in the regulation of gene expression is still unclear. Few micro array studies have shown differences in transcripts between wild type and KO-Tau mice (Oyama et al. 2004). A study reported the involvement of Tau in BAF-57 expression which is a protein of the chromatin remodeling SWI/SNF complex (Gómez de Barreda et al. 2010). Tau can bind to the histone deacetylase HDAC6, a cytosolic enzyme which is involved in tubulin-deacetylase. This Tau-HDAC6 interaction leads to the inhibition of the latter and thus to the acetylation of its targets (Perez et al. 2009). Likewise due to its ability to bind HDAC6 in cytosol, nuclear Tau could also regulate histone acetylase/deacetylase activity and thus modify the expression of genes. Furthermore, the effect of nuclear Tau on gene expression could be direct through DNA interaction or indirect through the interaction of Tau with proteins involved in gene expression regulation.

In nucleus Tau binds to and colocalizes with pericentromeric heterochromatin (PCH), a highly repeated major satellite DNA sequence rich in histone 3 trimethylated on lysine 9 (H3K9me3) and heterochromatin protein 1 alpha (HP1alpha), in primary neuronal cultures from wild-type mice (Mansuroglu et al. 2016). Interestingly, in neurons of Tau deficient mice the distribution of H3K9me3 and HP1alpha is disrupted, demonstrating a new physiological function of Tau regulating neuronal PCH integrity which is impaired in AD (Mansuroglu et al. 2016). Importantly, several studies demonstrated alteration of epigenetic markers in AD such as, cytoplasmic accumulation of histone 3 trimethylation on lysine 4 (H3K4me3) in human brain AD

(Mastroeni et al. 2015). Alterations of these epigenetic markers are associated with heterochromatin loss in Tau transgenic drosophila and human AD establishing this phenomenon as a toxic effector of Tau-induced neurodegeneration. Heterochromatin relaxation allows the aberrant expression of genes that are heterochromatically silenced and could lead to neurodegeneration (Frost et al. 2014). Dysregulated genes related to Tau induced neurodegeneration are potential targets for Tau-based therapies.

Tau as membrane/synaptic protein

Biochemical analysis showed that there is at least as much Tau in the human cerebral gray matter as in the underlying white matter (Khatoun, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1994). However, Tau immunohistochemically Tau is seen mainly distributed in the axonal compartment of adult neurons, but during pathological events, as in AD, is relocalized in the somato dendritic compartment which can lead to synaptic impairment (Hoover et al. 2010). Even if there is less Tau in dendrites, 70% of postsynaptic membranes are positively stained for Tau (Tai et al. 2012), which suggest a role in the synaptic transmission. Tau pathology correlates with cognitive deficit/synaptic impairment, thus emphasizing the importance of Tau for synaptic function and cognition (Braak and Braak 1991; C. Duyckaerts et al. 1997; Grober et al. 1999). Additionally, Tau mRNA is found in the dendritic spines (Malmqvist, Anthony, and Gallo 2014). There are several isoforms of Tau in neurons. Post-translational changes are also potent modifiers of Tau localization, as for example hyperphosphorylated Tau tends to relocalize in the somatodendritic compartment (Hoover et al. 2010; Tashiro et al. 1997). One hypothesis to explain this relocalisation would be the existence of a diffusion barrier that prevents Tau from entering somatodendritic compartment of mature and healthy neurons (X. Li et al. 2011). In pathological condition, where Tau is found hyperphosphorylated, Tau is detached

from microtubules and can diffuse to the somatodendritic compartment (Zempel et al. 2010, 201). Furthermore, there is evidence that suggests an activity-dependant transfer of Tau from presynaptic to postsynaptic compartment (Pooler et al. 2013; Sokolow et al. 2015; K. Yamada et al. 2014).

Tau function is closely related to its phosphorylation state. Phosphorylation of Tau is dependant of kinase activity, and it is interesting to note that two of the main kinases of Tau, namely GSK3beta and p38 MAPK, are found located in the post-synaptic compartment (E. M. Mandelkowitz et al. 1992). For example, the phosphorylation of Tau at Ser 396 is critical for the induction of long term depotentiation (LTD), a critical process for memory (Regan et al. 2015) and both GSK3beta and p38 MAPK can phosphorylate Tau at this site (Nicolas Sergeant et al. 2008). The required function of Tau for LTD was confirmed using Tau deficient mouse model that showed a selective impairment of LTD in hippocampus (Kimura et al. 2014). One possible mechanism resides in the interaction between Tau and the AMPA receptor subunit GluA2 that is necessary for LTD induction (Yagishita et al. 2015) and the ability for Tau to regulate AMPAR trafficking in the post-synaptic membrane (Suzuki and Kimura 2017). Additionally, Tau interaction with the Src Kinase Fyn modulate the membrane stability of the NR2B subunit of NMDAR, another critical component for synaptic plasticity and memory (Ittner et al. 2010; Mondragón-Rodríguez et al. 2012). Tau has also been linked to the main neurotrophic factor in the brain, the BDNF, as Tau is necessary for the increase of spine density induced by BDNF (Q. Chen et al. 2012) and Tau deletion result in a loss of synaptic mass possibly due to an impairment of BDNF signaling (Burnouf et al. 2013; Jiao et al. 2016). Several studies show that there is a synaptic hyperphosphorylation of Tau (Muntané et al. 2008; Takahashi et al. 2010) and that Tau is required for synaptic impairment induced by beta amyloid

peptide, as Tau deletion prevents amyloid toxicity (Rapoport et al. 2002; Roberson et al. 2007; Shipton et al. 2011).

Spatio-temporal evolution of Tau pathology, as hyperphosphorylation and aggregation is well correlated with the cognitive deficits, known as Braak Stages in AD (Braak and Braak 1991). As Tau function is critically linked to its phosphorylation state, one can assume that the abnormal hyperphosphorylation of Tau during disease can have 2 effects : a loss-of-function or a toxic gain-of-function. This mechanism could explain the possible link between Tau pathology and cognitive deficit. For instance, the well described interaction between Tau and Fyn, regulating NMDAR stability, is found decreased when Tau is hyperphosphorylated (Lau et al. 2016). Phosphorylation of Tau at Ser396 and Ser404 is correlated with a loss of synaptic markers and a reduction of dendritic spines (Pinheiro et al. 2016; Muntané et al. 2008). Other post translational modifications should not be discarded, as for example abnormal acetylation of Tau on Lys274 and Lys281, as found in AD, can impair AMPAR trafficking and LTP (long term potentiation) (Tracy et al. 2016).

Altogether, several studies show a critical role for Tau in synaptic function, and provide new evidence that those pathological changes of Tau results in synaptic impairment which translates into cognitive deficits.

Tau as mediator of metabolism

Brain hypometabolism and Tau phosphorylation

The maintenance of energy metabolism is a crucial process for all living cells. Metabolic alterations are an early event in neurodegenerative disorders including Tauopathies. Indeed, defects in energy metabolism, mitochondrial dysfunctions and oxidative stress are commonly described in these disorders. Increasing number of

studies show interrelation between alteration in metabolic control, mitochondrial dysfunction and hyperphosphorylation of Tau protein.

Glucose is the main source of energy in the brain, in particular for neurons that need a continuous supply of energy for the maintenance of their functions (Auer and Siesjö 1993). Therefore, any changes in glucose availability could have harmful effects for brain functions. Defects in energy metabolism are observed in several Tauopathies including AD, frontotemporal dementia (FTD), progressive supranuclear palsy (PSP) and corticobasal dementia (CBD) (Mosconi, Pupi, and De Leon 2008). Indeed, positron emission tomography (PET) imaging performed in patients affected by these diseases reveals that in restricted brain areas, including parietotemporal and frontotemporal regions and prefrontal cortex, there is a strong reduction of glucose utilization compared to that in aged-matched healthy persons (Mosconi, Pupi, and De Leon 2008; Teune et al. 2010). Recent studies showed that glucose deprivation induces in neuronal cells an increase of Tau phosphorylation, mediated by the activation of P38MAPK pathway (Elisabetta Lauretti and Praticò 2015), and in a h-Tau mouse model it produces learning and memory impairments (E. Lauretti et al. 2017). Additionally, it has been also demonstrated that the decrease of metabolic rate observed in a model of hibernating animal triggers PHF-like hyper-phosphorylation of Tau (Planel 2004; Arendt, Stieler, and Holzer 2015). However, in this model, Tau phosphorylation is fully reversible after arousal, suggesting that phosphorylation of Tau protein during hypometabolic state could represent a physiological adaptation with protective functions which is lost if the hypometabolism persists (Arendt, Stieler, and Holzer 2015).

Tau and insulin

At present, several studies showed a correlation between type 2 diabetes and the development of neurodegenerative diseases, such AD (Ott et al. 1999; Ho et al. 2004; Jimenez-Palomares et al. 2012). Additional studies show the interrelation between brain insulin signaling and neuronal plasticity in neuronal cells as well as *in vivo* (Wan et al. 1997; Chiu, Chen, and Cline 2008). However, the link between Tau functionality and the insulin signalling is still to be deciphered.

A recent study uncovered that Tau is necessary for normal insulin response in the brain (Marciniak et al. 2017). The abrogation of Tau expression, in a Tau knockout mouse model, impairs the long-term depression (LTD) induced by insulin in hippocampus, as well as the anorexigenic effect of insulin in hypothalamus. The hypothesis is that PTEN (phosphatase and tensin homologue on chromosome 10), an inhibitor of the PI3K-Akt pathway of the insulin receptor, physiologically binds Tau protein, abrogating its function. Therefore, the loss of function of Tau, as in Tauopathies, prevents the binding between Tau and PTEN, thus inducing a brain insulin resistance.

Tau and adenosine metabolism

In the past decades, several studies showed a possible protective effect of caffeine consumption towards Alzheimer's disease and others dementia (Flaten et al. 2014, Cellai et al. *in press*). Caffeine acts in the brain as a non specific antagonist of adenosine receptor, and it has been shown in Tau mouse model (THY-Tau22) that caffeine consumption prevents hyperphosphorylation of tau and related memory deficits, linking adenosine metabolism and tau pathology (Laurent et al. 2014). Following this results, our team showed that this beneficial effect of caffeine towards tau was linked to the blockade of the adenosine A2A receptor (Laurent et al. 2016). This is particularly interesting as A2AR is found overexpressed during AD (Albasanz

et al. 2008; Temido-Ferreira et al. 2018) and correlated with tau pathology progression in the brain (braak stages) (Orr et al. 2015). In light of these results, due to beneficial effect of the blockade of α_2 receptors for the pathophysiological development of tau, adenosinergic pathway should be consider for the clinical point of view as a potential therapeutic target (Cellai et al. *in press*).

Mitochondrial dysfunctions and Tau alterations: who come first?

Mitochondria are the power plants of neuronal cells, providing most of the ATP required for both the survival and functionality of neurons, as well in regulating the production of reactive oxygen species (ROS) and the signaling of cell apoptosis. During synaptic activation, mitochondria are of central importance for buffering Ca^{2+} influx (Werth and Thayer 1994), and supplying the ATP required for neuronal transmission, vesicle release, neurotransmitter recycling and re-establishment of ion gradient across the post-synaptic membrane (Attwell and Laughlin 2001). In neural cells mitochondria can be stationary, docked in regions requiring a constant provision of metabolic ATP such as synaptic terminals and dendritic spines (Kang et al. 2008; Sun et al. 2013). Alternatively, mitochondria are transported within the axon and dendrites along the microtubule binaries of the cells, to provide metabolic energy and accomplish Ca^{2+} buffering functions. Mitochondrial anterograde transport is mediated by the kinesin-1 motors (KIF5), while anterograde trafficking is dependent on the cytoplasmatic dynein motors (Pilling et al. 2006; Saxton and Hollenbeck 2012; Ruthel and Hollenbeck 2003). To maintain their functionality, distribution, size and morphology, mitochondria undergo fusion, fission and mitophagy. In mammalian cells. Mitochondrial fusion is mediated by three proteins: mitofusin1 and 2 (Mfn1, Mfn2), which are located in the outer mitochondrial membrane, and OPA1, in the internal mitochondria membrane (IMM) (H. Chen et al. 2003; Cipolat et al. 2004).

Fission, instead, is induced by the cytoplasmic dynamin-related protein 1 (Drp1) (Frank et al. 2001). Mitophagy is a quality control system by which dysfunctional mitochondria are degraded and eliminated (Youle and Narendra 2011). This process is principally mediated by the activity of PINK1 and the E3 ubiquitin-protein ligase, that binds and ubiquitinates abnormal mitochondria, respectively and recruit them for autophagosome-dependent degradation (D. Narendra et al. 2008; D. P. Narendra et al. 2010; Ziviani, Tao, and Whitworth 2010).

Dysfunctional and mislocalized mitochondria are considered as a common hallmark of several neurodegenerative diseases, including AD and Tauopathies (David et al. 2005; De Vos et al. 2008). Several studies show a correlation between Tau and the functionality, localization and dynamics of mitochondria. A recent study showed that in neuronal cells, decrease in ATP availability, induced by reduction of mitochondrial oxidative respiration, associates with alteration in the level, distribution, phosphorylation and aggregation of Tau protein. Treatment of primary rat striatal neurons with annonacin, MPP⁺ or NP-3, three inhibitors targeting specific mitochondrial respiratory complexes, causes a redistribution of Tau protein from the axon to the cell body and an increase in phosphorylation and level of Tau. Similarly, injection of annonacin and rotenone, an inhibitor of the respiratory complex I, induces redistribution, phosphorylation, accumulation and aggregation of Tau protein in neuronal cells in rodent brain (Escobar-Khondiker et al. 2007; E. S. Yamada et al. 2014; Höllerhage et al. 2009; Höglinger et al. 2005), suggesting that aberrant mitochondrial function associates with alteration of Tau protein functionality.

Correlation between mitochondria and Tau is not unidirectional: Tau indeed has been described to affect mitochondrial trafficking, dynamics and degradation.

Mitochondria are trafficked within neuronal cells along microtubules, the stability of which is dependent on Tau phosphorylation (Eva Maria Mandelkow et al. 2004; Tatebayashi et al. 2004). In neurons from mouse models of Tauopathy and AD, mislocalization of Tau disrupts mitochondrial trafficking, thus eventually affecting the distribution and supply of energy in neuronal cells (Zempel and Mandelkow 2015; Kopeikina et al. 2011). Additionally, neurons from Tau P301L knock-in mice, where a hypophosphorylation of Tau is reported, present a reduction in the number of axonal mitochondria (Rodríguez-Martín et al. 2016).

Recent studies show that phosphorylated Tau protein promotes mitochondrial fragmentation by interacting with Drp1, therefore causing mitochondrial deficiency and death of neurons (Manczak and Reddy 2012; Kandimalla et al. 2016). Overexpression of wild-type Tau protein has been shown to upregulate mitochondrial fusion, causing the accumulation of longer mitochondria and deficits in mitophagy by impairing the binding of PINK1/Parkin to mitochondria (Y. Hu et al. 2016; X.-C. Li et al. 2016).

In neuronal metabolism, metabolic energy regulation and Tau phosphorylation are strictly and reciprocally connected. However the dilemma of “who comes first” in the pathogenesis of Tauopathies and AD is still unknown and further investigations are required to find answers.

AMPK not only a metabolic regulator

Besides these early events, Tauopathies are also characterized by a deregulation of the metabolic sensor, AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK is a serine/threonine kinase which is abundantly expressed in brain neurons. AMPK is a heterotrimer which contains a catalytic subunit (α) and two regulatory subunits (β and

γ). Once activated, AMPK restores intracellular energy balance by stimulating ATP-producing pathways, by acting on glycolysis, mitochondria biogenesis, and inhibits anabolic ATP-consuming pathways, such as protein synthesis (Carling 2004). It has been shown that AMPK is deregulated in AD and in other Tauopathies where it co-localizes with hyper-phosphorylated Tau in pre-tangle and tangle-bearing neurons (Vingtdeux et al. 2011). *In vitro* studies using recombinant protein and *in vivo* studies showed that AMPK could phosphorylate Tau protein at several epitopes including Ser²⁶², Thr²³¹, Ser³⁵⁶ and Ser^{396/404} (Domise et al. 2016; Thornton et al. 2011; J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 2007). Moreover, recent studies revealed that a deficiency of AMPK reduces Tau pathology in the PS19 mouse model suggesting that AMPK could regulate Tau pathology (Domise et al. 2016).

Overall, these studies suggest that alteration of metabolic alteration, as well as AMPK activity could represent a potential target for therapeutic approach in the very early pathological phase of AD and Tauopathies.

Dysfunctions in the mitochondrial organelles, in particular reduction in oxidative respiration, has been described to alter Tau aggregation and localization in neuronal cells. However, alteration in Tau functionality has been associated to abnormality in mitochondrial trafficking, dynamics, such as mitochondrial fission and fusion, and with altered mitophagy. Alteration in neuronal metabolism is associated with several neurodegenerative diseases. AMP activated protein kinase (AMPK) is not only an intracellular energy sensor and regulator, but it also found overactivated in degenerating neurons.

Tau as a prion-like protein

In prion disorders, prion protein aggregates spread across the brain through an intercellular propagation. Once entered in healthy cells, these pathological aggregates

induce conformational changes and aggregation of physiological prion proteins (Fraser 2014).

The prion-like transmission was implicated in 1978 when treatment of fetal human primary neuronal cultures with extract from an AD brain was found to induce Alzheimer's like PHF (De Boni and Crapper 1978). Later, hyperphosphorylated, mutated and truncated Tau proteins were shown to template normal Tau in a prion-like fashion (A. C. Alonso, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996; Clavaguera et al. 2009; Holmes and Diamond 2014; Sanders et al. 2014; W. Hu et al. 2016). Injection of brain extracts from P301L transgenic mice or AD cases in the brains of mice over-expressing wild-Type Tau results in the appearance of Tau aggregation at the injection site and in distant and neuro-connected brain regions which suggest an intercellular and trans-synaptic spread of Tau pathology (Clavaguera et al. 2009, 2013; W. Hu et al. 2016; C. Dai et al. 2018). In Tau transgenic mice expressing the P301L Tau protein in the entorhinal cortex, Tau aggregation and synaptic degeneration was found in proximal brain regions: the CA1 region of hippocampus and granule cells of the dentate gyrus where the Tau transgene wasn't expressed. These observations reflect the ability of P301L misfolded Tau to induce aggregation of both Tau transgene and endogenous wild-type Tau which suggest the existence of “*trans-cellular*” propagation pathways (de Calignon et al. 2012; L. Liu et al. 2012; Dujardin et al. 2014).

In vitro studies brings further evidence in support on this potential Tau trans-synaptic propagation by demonstrating that the physical presence of synaptic contacts between neurons facilitate Tau pathology propagation (Calafate et al. 2015). Once injected in the hippocampus of transgenic mice overexpressing human Tau, AD hyperphosphorylated Tau is taken up by proximal neurons, induces seeding of human

Tau and is axonally transported in connected regions in a prion-like manner. This finding suggests a random spread of Tau pathology by proximity (W. Hu et al. 2016). Indeed, Tau seeds could be released from dying and damaged neurons and then taken up by unaffected cells in proximity. Such a mechanism might be one of the sources of the spread of Tau pathology and amenable to immunotherapy. Most of the Tau is secreted from neuronal plasma membrane by unconventional protein secretion (UPS) mechanism upon its detachment from microtubules due to hyperphosphorylation and is taken up by the recipient neurons from the extracellular space at random (Katsinelos et al. 2018).

In physiological conditions and under the influence of neuronal activity, Tau protein is released by neurons in a non-vesicular and unconventional way (Pooler et al. 2013; Wu et al. 2016; K. Yamada et al. 2014; Katsinelos et al. 2018). Tau release can also be mediated by exosomes (Saman et al. 2012; K. Yamada et al. 2014). Although this vesicular release of Tau represents only a small percentage of the extracellular Tau (Dujardin et al. 2014; Saman et al. 2012), a recent study showed that this exosomal Tau could play an important role in Tau propagation. Indeed, thanks to an adeno-associated virus-based model of Tau propagation, it was shown that depleting microglia or inhibit exosome synthesis dramatically suppress the propagation of Tau in vivo (Asai et al. 2015). Tunnelling nanotubes have also been identified as another mechanism for Tau aggregates transmission and interestingly exposure to exogenous Tau seems to increase the number of these tunnelling structures (Tardivel et al. 2016). Tau release from neurons can also be due to CSP α -dependent exocytosis, a co-chaperone dysregulated in AD (Tiwari et al. 2015).

Regarding the uptake of aggregated Tau by adjacent and connected neurons, it has been shown that low molecular weight aggregates and short fibrils of recombinant

Tau can be internalised by endocytosis. Indeed, the blocking of this Tau internalisation way by inhibiting dynamin reduces the propagation of Tau pathology (Wu et al. 2013).

In cultured cells and primary neurons, extracellular Tau has been shown to bind heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and thereby enter into cells by micropinocytosis (Holmes et al. 2013). Interestingly, HSPGs have been previously linked to prion protein (Snow et al. 1990). Thus, preventing prion seeds from binding HSPGs present at the cell surface may be a good way to slow down the progression of neurodegenerative diseases. This approach has been tried for prion disease with pentosan polysulfate which proved to be highly effective at inhibiting PrP^{Sc} formation both *in vitro* and in rodent models (Tsuboi, Doh-Ura, and Yamada 2009). This compound has also been tested in humans with Creutzfeldt-Jakob Disease and even it didn't halt progressive deterioration of the brain, it seems to prolong the survival of these patients (Holmes and Diamond 2014; Tsuboi, Doh-Ura, and Yamada 2009).

Certain Tau modifications, such as truncation appears to enhance Tau ability to aggregate and propagate between cells. Indeed some truncated Tau, such as Tau₂₄₃₋₄₄₁ (Tau-CTF24) showed higher propensity for aggregation, higher efficiency for propagation as well as faster and greater cell binding than aggregated full-length Tau (Matsumoto et al. 2015). These observations suggest that Tau truncation enhances its prion-like propagation and likely contributes to neurodegeneration.

Because of their exclusive ability to be picked up by cells, Tau oligomers and short fibrils have been described as essential species for Tau propagation (Wu et al. 2013). *In vitro* the best Tau particle size that can be taken up by cells is a decamer but if we look at the seeding potency, bigger particle size have better properties (Mirbaha et al.

2015) which suggest that a balance between transmissibility and propensity to aggregate is required for effective inter-neuronal propagation of pathogenic Tau species.

Prion diseases are also characterised by different strains of prions which induce distinct neurodegenerative phenotypes with reproducible patterns of neuropathology (Kaufman et al. 2016). Tau protein seems to exhibit a similar behaviour when brain homogenates prepared from different types of Tauopathy (AD, PSP and CBD), are injected into the brains of Tau transgenic mice (Boluda et al. 2015; Kaufman et al. 2016). The Tau inclusions formed in the brains of injected mice closely look like those originally injected (Clavaguera et al. 2009). Therefore, the nature of Tau seeds seems to be determinant for the structural characteristics of resultant Tau aggregates (Frost, Jacks, and Diamond 2009). The nature of Tau seeds could depend on its degree and/or pattern of hyperphosphorylation; dephosphorylation of hyperphosphorylated Tau from AD brain with protein phosphatase-2A was found to alter its ability to seed and propagate AD-like neurofibrillary tangles into argyrophilic grains when injected in the brains of human Tau transgenic mice (W. Hu et al. 2016).

Increasing number of studies on the spread of Tau pathology are in favour of the prion-like hypothesis. Pathological Tau oligomers and/or aggregates potentially propagate through *trans*-synaptic transmission which explain how the occurrence of a nidus of aggregated pathological Tau may seed physiological Tau and induce its aggregation and spread to distant brain regions during the onset of Tauopathies (Michel Goedert, Masuda-Suzukake, and Falcon 2017).

However, crucial distinctions remain between Tauopathies and prionopathies. Prion diseases are transmissible and despite decades of studies there is still no evidence that Tauopathies are transmitted from affected to unaffected individuals. Moreover, a

species barrier is present in prion diseases but absent in Tauopathies where human mutated Tau can recruit mouse or rat endogenous Tau. Finally, most prion disorders exhibit a rapid progression within the CNS whereas most neurodegenerative diseases progress over many years. Nonetheless all these findings strongly support the fact that Tau protein and especially extracellular Tau is a viable target for treatment of AD and Tauopathies (C.-L. Dai et al. 2017; C. Dai et al. 2018).

What biophysical state of Tau to target and why

As the main component of neuronal lesions of AD and Tauopathies, Tau represents a target of interest in therapeutics and clinical research against neurological disorders.

Tau occurs to be a highly flexible protein with no secondary structure (Jeganathan et al. 2008) or few secondary structures, notably short sequences corresponding to the PHF6* and PHF6, which have a beta-strand tendency in soluble state (Mukrasch et al. 2009). In addition, short secondary structure elements were shown to be stabilized by specific phosphorylations, interestingly corresponding to the AT8 or AT180 epitopes (Gandhi et al. 2015; Sibille et al. 2012; Schwalbe et al. 2015).

When it becomes pathologic, Tau accumulates into oligomers and forms toxic intraneuronal aggregates that are notably highly phosphorylated (Köpke et al. 1993). Moreover, it has been demonstrated that Tau phosphorylation and progression in AD correlate with the severity of dementia (Augustinack et al. 2002). Thus, targeting Tau involves preventing and/or reducing its abnormal phosphorylation, oligomerization or disaggregating Tau inclusions. Phosphorylation is the main post-translational modification of Tau and its deregulation is proposed to be at the origin of Tau pathology (Grundke-Iqbal et al. 1986). Although, the molecular role of Tau hyperphosphorylation in the process of PHF formation is still elusive and only few studies directly point out the intrinsic capacity of hyperphosphorylation to trigger

aggregation (A. del C. Alonso et al. 2001). Concerning the mechanism of phospho-dependent regulation of Tau functions, there is no precise evidence whether the pathological role of phosphorylation depends on specific phosphorylation sites or on an overall, not site-specific, increase of phosphorylation level. Moreover, the specific role of phospho-epitopes in the process of fiber formation is still under study to decipher the functional role of phosphorylation in Tau aggregation and to be able to give a better definition of what is a pathological “AD-Tau”. The identification of the phosphorylation patterns responsible for converting Tau into an AD-Tau is a first step to find new therapeutic kinase targets (J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 2007; Despres et al. 2017).

Thus, several studies have been focused on targeting kinases or phosphatases regulating Tau phosphorylation to treat AD and related dementia. Among them, inhibition of the serine-threonine kinase glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) has been by far the most studied as it is also involved in the production of A β peptides (Eldar-Finkelman and Martinez 2011; Phiel et al. 2003). Only a small number of molecules have been tested *in vivo* but they have demonstrated interesting effects in transgenic mouse models of Tauopathies. Indeed, in these models, a reduction of both Tau phosphorylation and levels of aggregated insoluble Tau associated with cognitive improvements have been observed (Noble et al. 2005; Caccamo et al. 2007; Licht-Murava et al. 2016). However, most GSK-3 inhibitors have not succeeded in clinical trials in human subjects yet because of lack of clinical improvements or therapeutic effects. Others are still undergoing clinical development (Lovestone et al. 2015; Hampel et al. 2015; Pandey and DeGrado 2016). Given this and the non-specificity of kinases, other therapeutic approaches must be considered.

Prevention of Tau aggregation by inhibition of the formation of oligomers and fibrils represents a rational therapeutic approach as it seems to be specific to Tau protein and its toxic species. In this context, Tau aggregation/PHF inhibitors have been developed and have demonstrated efficiency in cellular and transgenic mice models such as methylthioninium (methylene blue) or anthraquinone derivatives (C. M. Wischik et al. 1996; Pickhardt et al. 2005, 2007; Melis et al. 2015). These kinds of molecules are able to disrupt Tau aggregates, to prevent Tau-Tau binding interactions without impairing its normal tubulin interactions as well as producing benefits in behaviour and Tau pathology. Only methylene blue, a Tau anti-aggregant, has been tested in humans and reached phase II clinical trials during which it suggested a positive therapeutic effect (Claude M. Wischik et al. 2015). However, a recent feedback on a phase III trial of the methylene blue derivate, Leuco-methylthioninium bis(hydromethanesulfonate) reports negative results on disease progression in patients with mild to moderate AD (Gauthier et al. 2016).

As the most toxic form of Tau is still in debate, proteins involved in both Tau phosphorylation and structural changes can be interesting for therapeutics. Notably, peptidyl-prolyl isomerases (PPIases) such as FKBP52 or Pin1 are able to regulate Tau structure and function before its Pro-residues (Blair et al. 2015). In this sense, FKBP52 has been recently shown to play a role in Tau pathogenicity by inducing the aggregation of truncated forms of Tau *in vitro* (Giustiniani et al. 2015) suggesting that FKBP52 could be a potential target in Tauopathies.

Another aspect for therapies targeting Tau involves degradation pathways. Cells are capable of handling misfolded proteins or aggregates through degradation pathways involving either the Ubiquitin-Proteasome System (UPS) or the Autophagy-Lysosome Pathway (Ciechanover and Kwon 2017). These mechanisms are even more important

for neurons to clear or recycle cell components. Indeed, as they are post-mitotic cells, they are not able to clear toxic substances via mitosis and they are more sensitive to protein aggregation.

Tau is known to be degraded through the proteasome system associated with chaperones (Petrucci et al. 2004; Tseng et al. 2008) and recently also via autophagy (Kim et al. 2017). Moreover, Tau interferes with the normal functions of UPS (Abisambra et al. 2013; Myeku et al. 2015) and impairment of protein homeostasis is associated with neurodegenerative diseases such as AD (Opattova et al. 2015).

In this sense, approaches targeting chaperones of the UPS involved in Tau metabolism have been tested in mouse models. For example, EC102, an HSP90 inhibitor has shown significant results concerning the reduction of p-Tau species in a mouse model of Tauopathy (Dickey et al. 2007). Furthermore, recent results confirm that induction of autophagy clearance system is also an interesting pathway to follow. Indeed, it has been demonstrated that activation of autophagy by the AMPK-ULK1 axis or by the AMPK-mTOR pathway can both rescue memory impairment and reduce Tau aggregates in AD mouse models (Zhang et al. 2017; Kim et al. 2017). Together, these findings indicate the importance of degradation pathways in Tauopathies and suggest that they could offer a promising therapeutic target.

Recently, new alternatives to target Tau have seen the light of day such as immunization, using Tau polypeptides or antibodies, which may also target extracellular Tau.

Tau immunization

Why targeting Tau by immunotherapy?

A lot of different therapeutic strategies have been studied to evaluate their potential effectiveness in treatment of Tauopathies. Unfortunately, most of these approaches

did not succeed to significantly rescue the cognitive deficits in patients. In view of the potential prion-like character of Tau protein, one of the best approaches to target the extracellular pathological Tau whereas these potential immunotherapeutic treatments still face several challenges. First, only a small percentage of antibodies (~0.1%) cross the blood brain barrier, thus it may be helpful to find ways to improve antibody penetration into the brain. This problem is partially solved by the fact that AD patients present a BBB disruption allowing a greater access to the CNS for peripheral IgG (Bowman et al. 2007; Chalbot et al. 2011). The use of chaperone proteins, transient opening of the BBB and direct infusion of antibodies into the brain with a time-released pump are also considered. Second, it is known that the pathology of AD and other neurodegenerative diseases settle and evolve for several years or even decades before the appearance of the first symptoms suggesting that a development of early and sensitive biomarkers in order to be able to treat these patients as early as possible and test immunotherapies for longer periods of time. Finally, further studies are needed concerning the location and the mode of clearance of the antibody-antigen complexes to avoid clogging of the clearance pathway during long-term treatment.

Up to now, many research teams focused on immunotherapy targeting the amyloid beta peptide and showed a significant reduction in A β deposits (Bard et al. 2000; Schenk et al. 1999) as well as a significant decrease in cognitive decline in AD mouse models (Janus et al. 2000; Morgan et al. 2000). In view of its positive outcomes in mouse models, passive and active immunotherapy clinical trials began targeting A β peptide but some of them had to be halted because of inefficiency (Salloway et al. 2014; Doody et al. 2014) or toxicity (Orgogozo et al. 2003).

It seems that in human AD patients, targeting only the A β peptide is not enough to reduce Tau pathology and enhance cognitive functions. In AD, the severity of cognitive decline correlates better with the evolution of neurofibrillary tangles (NFTs) than amyloid deposits (Wilcock and Esiri 1982; Nelson et al. 2012; Schwarz et al. 2016). Moreover, a previous study conducted on a mouse model of AD that develop both aspect of the disease showed that anti- A β immunotherapy had no effect on Tau pathology and did not improve cognitive functions (Oddo et al. 2006). Taken together, these studies strongly support that a reduction of Tau pathology is needed to enhance cognitive functions.

Results from anti-Tau immunotherapeutic studies in AD mouse models are promising. By targeting different pathological epitopes of Tau, immunotherapeutic studies showed a reduction of Tau pathology and cognitive deficit in different mouse models of Tauopathy or AD (Asuni et al. 2007; Boutajangout, Quartermain, and Sigurdsson 2010; Troquier et al. 2012; C. Dai et al. 2018). Finally, it has been recently demonstrated that a passive anti-Tau immunotherapy in 3 \times Tg-AD mice could successfully reduce not only the Tau pathology but also inhibit the A β pathology (C.-L. Dai et al. 2017).

Recently, the use of a novel class of antibody called VHH (Variable Heavy chain of the Heavy chain only antibody) are also investigated as a new immunotherapeutic strategy. VHH are also called single domain antibodies or nanobodies. They are constituted of a unique chain which corresponds to the variable heavy chain from the Immunoglobulin G from *Camelidae* (Hamers-Casterman et al. 1993). Due to their small size and high stability, they have been described to cross the blood brain barrier more easily than classic antibodies. They can easily be modified to penetrate into the cytoplasm of cells and bind specifically to their target protein (T. Li, Bourgeois, et al.

2016). Clinical trials are actually ongoing with bivalent and trivalent VHH to treat different diseases such as Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (Caplacizumab, Ablynx, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02553317) and Respiratory Syncytial Virus infection in infants (ALX-0171, Ablynx, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02979431). Different studies have been conducted to evaluate the potential of VHH to target the pathological amyloid form of different proteins such as lysozyme (Dumoulin et al. 2003; Rutgers et al. 2011; De Genst et al. 2010). And recently, VHH showed their potential as diagnostic tool to target A β plaques and hyperphosphorylated Tau, with an affinity and specificity very close to antibodies already used for detecting these pathologic features (T. Li, Vandesquille, et al. 2016). VHHs have a great potential in future diagnostic and therapeutic strategies for the treatment of Tau pathology.

Altogether, these results show the great potential of Tau protein as a target in immunotherapeutic trials for AD treatment.

Tau active versus Tau passive immunization

There are two types of immunotherapies. And even they both aim to slow down and prevent the cognitive decline associated with AD, active and passive immunotherapies have respective advantages and disadvantages.

Active immunization, known to stimulate the cellular and humoral immune system and promote the production of anti-antigen antibodies, consists in the injection of an antigen combined with an immune boosting adjuvant. The main advantage of this type of immunotherapy is the induction of a long-term antibody production in a large population. If effective, active immunotherapy can be considered as a minimally invasive and cost-effective treatment (Lemere 2013; Lemere and Masliah 2010). But

it should also be borne in mind that active vaccination induces a T cell response that can increase the risk of a deleterious immune response through a release of pro-inflammatory cytokines (too strong and pro-inflammatory adjuvant) or even more problematic, a recognition of the antigen as a self-protein.

Active immunotherapy leads to a polyclonal antibody response, which generates loads of antibodies recognizing multiple and sometimes overlapping epitopes on the target protein. This broad coverage can be seen as a significant advantage but can also become a disadvantage when the targeted antigen is a specific pathological form of an intrinsic protein with major physiological functions.

Regarding anti-Tau immunotherapy, active immunization of C57BL/6 wild-type mice with full length recombinant human Tau led to an encephalomyelitis, which confirms potential autoimmune toxicity of active vaccinations targeting the physiological Tau. However, Asuni and Sigurdsson's Team showed that this autoimmune problem isn't systematic thanks to an active immunization with a Tau phosphopeptide which allowed a reduction of Tau pathology and improved cognitive phenotypes in Tau transgenic mice (JNPL3) (Panza et al. 2016; Asuni et al. 2007).

Among active vaccines in clinical trials, AADvac1 (Axon Neuroscience, Bratislava, Slovak Republic) was the first anti-Tau vaccine. It's a synthetic peptide targeting misfolded Tau derived from amino acids 294 to 305 (KDNIKHVPGGGS), coupled to keyhole limpet hemocyanin, and administered with an Alhydrogel alum adjuvant. Three single doses of AAD-vac1 were assessed every month to test its safety, tolerability and efficacy in mild-to-moderate AD patients (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01850238). The most common adverse events were injection site reactions but there were no cases of meningoencephalitis or vasogenic oedema. In this first-in-man study, AADvac1 showed a favourable safety profile as well as an

excellent immunogenicity. It was pursued with an open-label phase, in which all patients received another three doses of AADvac1 at monthly intervals but, at present, no information is available about this part of the study. Patients completing this 24-week study had the opportunity to enter a further 18-month open-label extension (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02031198, FUNDAMANT). A separate 24-month Phase II study is currently ongoing using AADvac1 vaccine (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02579252, ADA-MANT) (Kontsekova et al. 2014; Congdon and Sigurdsson 2018).

Another active vaccine, ACI-35 (AC Immune AG and Janssen Pharmaceuticals) entered a Phase Ib clinical study. It is a liposomal-based phospho-Tau peptide including phosphorylated S396 and S404 residues. This trial compares the effect of two doses of ACI-35 in people with mild-to-moderate AD to investigate its safety, tolerability and immunogenicity (Theunis et al. 2013; Congdon and Sigurdsson 2018).

Passive immunization doesn't require a stimulation of the patient's immune system because it consists in regular injections of specific monoclonal antibodies. The main benefit of this treatment is that it directly targets the pathological epitope of the protein of interest without any risk to damage its physiological form (Lemere 2013; Lemere and Masliah 2010). On the downside, this treatment is invasive and less profitable due to the need of a large production of expensive humanized monoclonal antibodies. Thereby, at first glance, passive immunotherapy appears to be less feasible for long-term treatment of a large population. Repeated injection of antibodies over time may lead to the formation of anti-antibodies, which could potentially have a neutralizing effect or lead to side effects such as glomerulonephritis and vasculitis. However, since at the slightest sign of toxicity, passive immunotherapy can be stopped very easily, these clinical studies are amply justified and may help to target

very promising pathological epitopes for AD treatment that can afterward be used in generating active vaccines.

One of the first Tau antibodies tested in clinical development for AD treatment was RG7345 (RO6926496, MAb86, F. Hoffmann-La Roche Ltd.). It's a human monoclonal antibody targeting the specific Tau-phosphorylated epitope "pS422". Unfortunately, after Phase 1, this antibody project was discontinued (Collin et al. 2014; Panza et al. 2016).

The antibody BMS-986168 (IPN007, Bristol-Myers Squibb Company) is a humanized monoclonal antibody recognising N-terminally fragmented forms of Tau (eTau). Although IPN007 isn't currently being tested for AD but for PSP, eTau was originally isolated from familial AD patient-derived pluripotent stem cells. After having controlled the safety and tolerability of this antibody in healthy subject, a Phase I trial began to evaluate BMS-986168 injections effects in 48 patients with PSP (Study CN002-003, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02460094). An extension study in PSP patients who participated to the previous study started to evaluate the long-term tolerability of multiple intravenous infusions of IPN007 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03068468).

A Phase I clinical study in PSP patients was carried out with the recombinant humanized anti-Tau C2N-8E12 antibody (C2N Diagnostics, LLC, MO, USA and AbbVie, IL, USA) which recognizes an aggregated and extracellular form of pathological Tau implicated in transneuronal propagation of Tau pathology, according to the results obtained in cellular and mouse models (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02494024) (Yanamandra et al. 2013, 2015; Congdon and Sigurdsson 2018). This trial are now recruiting for a phase II study (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02985879 and NCT02880956).

A Phase I trial with an antibody RO7105705 (AC Immune SA, Genentech, and Hoffmann-La Roche) targeting the phosphorylated serine 409 epitope is at present ongoing with patients with mild-to-moderate AD (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02820896).

Finally, three new antibodies are now entering for Phase I study : LY3303560 (Eli Lilly, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02754830 and NCT03019536), JNJ-63733657 (Janssen Pharmaceuticals, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03375697) and UCB0107 (UCB Biopharma, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03464227). There is still not precise data concerning the targeted epitope but LY3303560 seems to recognize a conformational epitope whereas JNJ-63733657 bind to the middle region of Tau. UCB0107 binds to the C-terminus part of the proline rich domain and *in vitro* studies showed that this antibody reduce the seeding of Tau (Rogers 2018).

Due to its minimally invasive and cost-effective properties, active immunotherapy seems to be the best potential immunological treatment. While less feasible for long-term treatment, passive immunotherapy may be very helpful to target promising pathological epitopes for AD treatment.

	Clinical Trials	Target epitopes	Status	Target Disease
Active tau-based immunotherapy	AADvac1 (Axon Neuroscience SE) NCT02579252	²⁹⁴ KDNIKHVPGGGS ₃₀₅	Phase II	AD
	ACI-35 (AC Immune AG)	³⁹³ VYKpSPVVSgDTpSPRHL ₄₀₈	Phase Ib	AD
Passive tau-based Immunotherapy	C2N-8E12 (C2N Diagnostics) NCT02880956 NCT02985879	²⁵ DQGGYT ₃₀	Phase II	AD, PSP
	BMS-986168 (Bristol-Myers Squibb Company) NCT03068468	⁹ EVMEDHAGTY ₁₈	Phase II	PSP
	RO7105705 (AC Immune SA, Genentech, and Hoffmann-La Roche) NCT02820896 NCT02985879	⁴⁰⁹ PS	Phase I	AD
	LY3303560 (Eli Lilly) NCT02754830 NCT03019536	Conformational epitope	Phase I	AD
	JNJ-63733657 (Janssen Pharmaceuticals) NCT03375697	Middle region of Tau	Phase I	AD
	UCB0107 (UCB Biopharma) NCT03464227	²³⁵ SPSSAKSRLQTA ₂₄₆	Phase I	AD

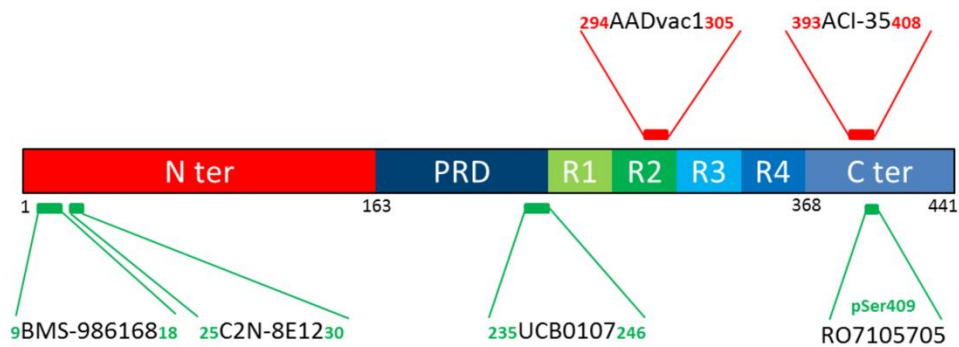


Table 1: Current active and passive Tau-based immunotherapies for Alzheimer’s disease (AD) and progressive supranuclear palsy (PSP).

Conclusions

Tau appears to be a pleiotropic protein. Besides, its established function to stabilize the microtubule network in the neuron, there are several pools of Tau within the neuron, and these are differentially regulated and have multiple functions. New tools need to be developed to clearly understand the respective contributions of Tau in different cellular compartments. Functions and dysfunctions of Tau proteins are linked to their localization and state within the neuron. As AD and other Tauopathies are characterized by Tau pathology, it appears well-founded to consider Tau proteins as ideal targets for therapeutic strategies and in spite of an unfortunate lack of information regarding the results of clinical studies that have been carried out so far, Tau immunotherapy seems to be a very promising way to treat patients with AD and other Tauopathies. Nevertheless, a better understanding of the mechanisms underlying Tau aggregation and propagation as well as the development of biomarkers for early diagnosis are still missing to propose effective treatment.

Acknowledgments:

The authors acknowledge the “Alzheimer & Tauopathies” Inserm group in the Jean-Pierre Aubert Research Center.

This article was conceived and written during Visiting Professorship of KI at the University of Lille with the support of the LabEx DISTALZ.

MA is supported by INSERM; KC, CE, MD, MH and CS are supported by Université de Lille; MG and CL are supported by CHRU de Lille et Région Hauts-de-France; CD is supported by Labex Distalz. VG is supported by Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20160936000); LB is a CNRS research scientist.

Bibliography

- Abisambra, J. F., U. K. Jinwal, L. J. Blair, J. C. O’Leary, Q. Li, S. Brady, L. Wang, et al. 2013. “Tau Accumulation Activates the Unfolded Protein Response by Impairing Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation.” *Journal of Neuroscience* 33 (22): 9498–9507. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5397-12.2013>.
- Ahmed, Tariq, Ann Van der Jeugd, David Blum, Marie-Christine Galas, Rudi D’Hooge, Luc Buee, and Detlef Balschun. 2014. “Cognition and Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice with a Homozygous Tau Deletion.” *Neurobiology of Aging* 35 (11): 2474–78. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005>.
- Alafuzoff, I., K. Iqbal, H. Friden, R. Adolfsson, and B. Winblad. 1987. “Histopathological Criteria for Progressive Dementia Disorders: Clinical-Pathological Correlation and Classification by Multivariate Data Analysis.” *Acta Neuropathologica* 74 (3): 209–25. <https://doi.org/10.1007/BF00688184>.
- Albasanz, José L., Sandra Perez, Marta Barrachina, Isidro Ferrer, and Mairena Martín. 2008. “Up-Regulation of Adenosine Receptors in the Frontal Cortex in Alzheimer’s Disease.” *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 18 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x>.
- Alonso, A. C., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1996. “Alzheimer’s Disease Hyperphosphorylated Tau Sequesters Normal Tau into Tangles of Filaments and Disassembles Microtubules.” *Nature Medicine* 2 (7): 783–87.
- Alonso, A. C., T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1994. “Role of Abnormally Phosphorylated Tau in the Breakdown of Microtubules in Alzheimer Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (12): 5562–66.
- Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 2001. “Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6923–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>.
- Alonso, Alejandra D., John Di Clerico, Bin Li, Christopher P. Corbo, Maria E. Alaniz, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2010. “Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined Causes Neurodegeneration.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (40): 30851–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110957>.
- Alonso, Alejandra del C., Tanweer Zaidi, Michal Novak, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2001. “Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (12): 6923–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>.
- Arendt, Thomas, Jens Stieler, and Max Holzer. 2015. “Brain Hypometabolism Triggers PHF-like Phosphorylation of Tau, a Major Hallmark of Alzheimer’s Disease Pathology.” *Journal of Neural Transmission* 122 (4): 531–39. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1342-8>.
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, and B. T. Hyman. 1992. “Neurofibrillary Tangles but Not Senile Plaques Parallel Duration and Severity of Alzheimer’s Disease.” *Neurology* 42 (3 Pt 1): 631–39.
- Asai, Hirohide, Seiko Ikezu, Satoshi Tsunoda, Maria Medalla, Jennifer Luebke, Tarik Haydar, Benjamin Wolozin, Oleg Butovsky, Sebastian Kügler, and Tsuneya Ikezu. 2015. “Depletion of Microglia and Inhibition of Exosome Synthesis Halt Tau Propagation.” *Nature Neuroscience* 18 (11): 1584–93. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>.
- Asuni, Ayodeji A., Allal Boutajangout, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2007. “Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (34): 9115–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>.

- Attwell, David, and Simon B. Laughlin. 2001. "An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21 (10): 1133–45. <https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>.
- Auer, Roland N., and Bo K. Siesjö. 1993. "Hypoglycaemia: Brain Neurochemistry and Neuropathology." *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 7 (3): 611–25. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80210-1](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80210-1).
- Augustinack, Jean C., Anja Schneider, Eva Maria Mandelkow, and Bradley T. Hyman. 2002. "Specific Tau Phosphorylation Sites Correlate with Severity of Neuronal Cytopathology in Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica* 103 (1): 26–35. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>.
- Bard, F., C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, et al. 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* 6 (8): 916–19. <https://doi.org/10.1038/78682>.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1993. "Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding." *Neuron* 11 (1): 153–63.
- Blair, Laura J., Jeremy D. Baker, Jonathan J. Sabbagh, and Chad A. Dickey. 2015. "The Emerging Role of Peptidyl-Prolyl Isomerase Chaperones in Tau Oligomerization, Amyloid Processing, and Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 133 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1111/jnc.13033>.
- Boluda, Susana, Michiyo Iba, Bin Zhang, Kevin M. Raible, Virginia M-Y. Lee, and John Q. Trojanowski. 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* 129 (2): 221–37. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>.
- Bou Samra, Elias, Géraldine Buhagiar-Labarchède, Christelle Machon, Jérôme Guitton, Rosine Onclercq-Delic, Michael R. Green, Olivier Alibert, Claude Gazin, Xavier Veaute, and Mounira Amor-Guéret. 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, Allal, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2010. "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (49): 16559–66. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010>.
- Bowman, G. L., J. A. Kaye, M. Moore, D. Waichunas, N. E. Carlson, and J. F. Quinn. 2007. "Blood-Brain Barrier Impairment in Alzheimer Disease: Stability and Functional Significance." *Neurology* 68 (21): 1809–14. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000262031.18018.1a>.
- Boxer, Adam L., Jin-Tai Yu, Lawrence I. Golbe, Irene Litvan, Anthony E. Lang, and Günter U. Höglinger. 2017. "Advances in Progressive Supranuclear Palsy: New Diagnostic Criteria, Biomarkers, and Therapeutic Approaches." *The Lancet. Neurology* 16 (7): 552–63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30157-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30157-6).
- Boyne, L. J., A. Tessler, M. Murray, and I. Fischer. 1995. "Distribution of Big Tau in the Central Nervous System of the Adult and Developing Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 358 (2): 279–93. <https://doi.org/10.1002/cne.903580209>.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. "Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239–59.
- Brion, J. P., A. M. Couck, E. Passareiro, and J. Flament-Durand. 1985. "Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease: An Immunohistochemical Study." *Journal of Submicroscopic Cytology* 17 (1): 89–96.
- Buée Scherrer, V., P. R. Hof, L. Buée, B. Leveugle, P. Vermersch, D. P. Perl, C. W. Olanow, and A. Delacourte. 1996. "Hyperphosphorylated Tau Proteins Differentiate

- Corticobasal Degeneration and Pick's Disease." *Acta Neuropathologica* 91 (4): 351–59.
- Buée-Scherrer, V., L. Buée, P. R. Hof, B. Leveugle, C. Gilles, A. J. Loerzel, D. P. Perl, and A. Delacourte. 1995. "Neurofibrillary Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex of Guam. Immunochemical Characterization of Tau Proteins." *The American Journal of Pathology* 146 (4): 924–32.
- Buée-Scherrer, V., L. Buée, B. Leveugle, D. P. Perl, P. Vermersch, P. R. Hof, and A. Delacourte. 1997. "Pathological Tau Proteins in Postencephalitic Parkinsonism: Comparison with Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders." *Annals of Neurology* 42 (3): 356–59. <https://doi.org/10.1002/ana.410420312>.
- Burnouf, Sylvie, Alberto Martire, Maxime Derisbourg, Cyril Laurent, Karim Belarbi, Antoine Leboucher, Francisco J. Fernandez-Gomez, et al. 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/accel.12018>.
- Caccamo, Antonella, Salvatore Oddo, Lana X. Tran, and Frank M. LaFerla. 2007. "Lithium Reduces Tau Phosphorylation but Not A β or Working Memory Deficits in a Transgenic Model with Both Plaques and Tangles." *The American Journal of Pathology* 170 (5): 1669–75. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061178>.
- Calafate, Sara, Arjan Buist, Katarzyna Miskiewicz, Vinoy Vijayan, Guy Daneels, Bart de Strooper, Joris de Wit, Patrik Verstreken, and Diederik Moechars. 2015. "Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation." *Cell Reports* 11 (8): 1176–83. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>.
- Calignon, Alix de, Manuela Polydoro, Marc Suárez-Calvet, Christopher William, David H. Adamowicz, Kathy J. Kopeikina, Rose Pitstick, et al. 2012. "Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease." *Neuron* 73 (4): 685–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>.
- Carling, David. 2004. "The AMP-Activated Protein Kinase Cascade - A Unifying System for Energy Control." *Trends in Biochemical Sciences* 29 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.005>.
- Chalbot, Sonia, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, Tormod Fladby, Niels Andreasen, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2011. "Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Permeability in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 25 (3): 505–15. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101959>.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, and David C. Chan. 2003. "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development." *Journal of Cell Biology* 160 (2): 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>.
- Chen, Qian, Zhou Zhou, Lei Zhang, Yuan Wang, Yan-wen Zhang, Min Zhong, Shang-cheng Xu, Chun-hai Chen, Li Li, and Zheng-ping Yu. 2012. "Tau Protein Is Involved in Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons in Response to BDNF." *Neurochemistry International* 60 (3): 233–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.013>.
- Chiu, Shu Ling, Chih Ming Chen, and Hollis T. Cline. 2008. "Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function In Vivo." *Neuron* 58 (5): 708–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.014>.
- Cho, Jae-Hyeon, and Gail V. W. Johnson. 2004. "Primed Phosphorylation of Tau at Thr231 by Glycogen Synthase Kinase 3beta (GSK3beta) Plays a Critical Role in Regulating Tau's Ability to Bind and Stabilize Microtubules." *Journal of Neurochemistry* 88 (2): 349–58.
- Ciechanover, Aaron, and Yong Tae Kwon. 2017. "Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration."

- Cipolat, S., O. M. de Brito, B. Dal Zilio, and L. Scorrano. 2004. "OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (45): 15927–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>.
- Clavaguera, Florence, Hiroyasu Akatsu, Graham Fraser, R. Anthony Crowther, Stephan Frank, Jürgen Hench, Alphonse Probst, et al. 2013. "Brain Homogenates from Human Tauopathies Induce Tau Inclusions in Mouse Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (23): 9535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. "Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain." *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- Cleveland, D. W., S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1977. "Physical and Chemical Properties of Purified Tau Factor and the Role of Tau in Microtubule Assembly." *Journal of Molecular Biology* 116 (2): 227–47.
- Collin, Ludovic, Bernd Bohrmann, Ulrich Göpfert, Krisztina Oroszlan-Szovik, Laurence Ozmen, and Fiona Grüniger. 2014. "Neuronal Uptake of Tau/PS422 Antibody and Reduced Progression of Tau Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 10): 2834–46. <https://doi.org/10.1093/brain/awu213>.
- Congdon, Erin E., and Einar M. Sigurdsson. 2018. "Tau-Targeting Therapies for Alzheimer Disease." *Nature Reviews. Neurology*, June. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>.
- Crary, John F., John Q. Trojanowski, Julie A. Schneider, Jose F. Abisambra, Erin L. Abner, Irina Alafuzoff, Steven E. Arnold, et al. 2014. "Primary Age-Related Tauopathy (PART): A Common Pathology Associated with Human Aging." *Acta Neuropathologica* 128 (6): 755–66. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1349-0>.
- Cuchillo-Ibanez, Inmaculada, Anjan Seereeram, Helen L. Byers, Kit-Yi Leung, Malcolm A. Ward, Brian H. Anderton, and Diane P. Hanger. 2008. "Phosphorylation of Tau Regulates Its Axonal Transport by Controlling Its Binding to Kinesin." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (9): 3186–95. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109181>.
- Dai, Chun-ling, Wen Hu, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, and Khalid Iqbal. 2018. "Tau Passive Immunization Blocks Seeding and Spread of Alzheimer Hyperphosphorylated Tau-Induced Pathology in 3 × Tg-AD Mice." *Alzheimer's Research & Therapy* 10 (January). <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0341-7>.
- Dai, Chun-Ling, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, and Khalid Iqbal. 2017. "Tau Passive Immunization Inhibits Not Only Tau but Also Aβ Pathology." *Alzheimer's Research & Therapy* 9 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0227-5>.
- David, Della C., Susanne Hauptmann, Isabel Scherping, Katrin Schuessel, Uta Keil, Patrizia Rizzu, Rivka Ravid, et al. 2005. "Proteomic and Functional Analyses Reveal a Mitochondrial Dysfunction in P301L Tau Transgenic Mice." *Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 23802–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500356200>.
- De Boni, U., and D. R. Crapper. 1978. "Paired Helical Filaments of the Alzheimer Type in Cultured Neurons." *Nature* 271 (5645): 566–68.
- De Genst, Erwin J., Tim Williams, Joke Wellens, Elizabeth M. O'Day, Christopher A. Waudby, Sarah Meehan, Mireille Dumoulin, et al. 2010. "Structure and Properties of a Complex of α-Synuclein and a Single-Domain Camelid Antibody." *Journal of Molecular Biology* 402 (2): 326–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.001>.
- De Vos, Kurt J., Andrew J. Grierson, Steven Ackerley, and Christopher C. J. Miller. 2008. "Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases." *Annual Review of Neuroscience* 31 (1): 151–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711>.

- Delacourte, A., and A. Defossez. 1986. "Alzheimer's Disease: Tau Proteins, the Promoting Factors of Microtubule Assembly, Are Major Components of Paired Helical Filaments." *Journal of the Neurological Sciences* 76 (2–3): 173–86.
- Despres, Clément, Cillian Byrne, Haoling Qi, François-Xavier Cantrelle, Isabelle Huvent, Béatrice Chambraud, Etienne-Emile Baulieu, et al. 2017. "Identification of the Tau Phosphorylation Pattern That Drives Its Aggregation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (34): 201708448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708448114>.
- Dickey, Chad A., Adeela Kamal, Karen Lundgren, Natalia Klosak, Rachel M. Bailey, Judith Dunmore, Peter Ash, et al. 2007. "The High-Affinity HSP90-CHIP Complex Recognizes and Selectively Degrades Phosphorylated Tau Client Proteins." *Journal of Clinical Investigation* 117 (3): 648–58. <https://doi.org/10.1172/JCI29715>.
- Domise, Manon, Sébastien Didier, Claudia Marinangeli, Haitian Zhao, Pallavi Chandakkar, Luc Buée, Benoit Viollet, Peter Davies, Philippe Marambaud, and Valérie Vingtdeux. 2016. "AMP-Activated Protein Kinase Modulates Tau Phosphorylation and Tau Pathology in Vivo." *Scientific Reports* 6 (February): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26758>.
- Doody, Rachele S., Ronald G. Thomas, Martin Farlow, Takeshi Iwatsubo, Bruno Vellas, Steven Joffe, Karl Kieburtz, et al. 2014. "Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 370 (4): 311–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312889>.
- Drechsel, D N, A A Hyman, M H Cobb, and M W Kirschner. 1992. "Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau." *Molecular Biology of the Cell* 3 (10): 1141–54.
- Drewes, G., A. Ebnet, U. Preuss, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1997. "MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption." *Cell* 89 (2): 297–308.
- Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. "Microtubule-Associated Protein/Microtubule Affinity-Regulating Kinase (P110mark). A Novel Protein Kinase That Regulates Tau-Microtubule Interactions and Dynamic Instability by Phosphorylation at the Alzheimer-Specific Site Serine 262." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7679–88.
- Dujardin, Simon, Katia Lécolle, Raphaëlle Caillierez, Séverine Bégard, Nadège Zommer, Cédric Lachaud, Sébastien Carrier, et al. 2014. "Neuron-to-Neuron Wild-Type Tau Protein Transfer through a Trans-Synaptic Mechanism: Relevance to Sporadic Tauopathies." *Acta Neuropathologica Communications* 2 (January): 14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>.
- Dumoulin, Mireille, Alexander M. Last, Aline Desmyter, Klaas Decanniere, Denis Canet, Göran Larsson, Andrew Spencer, et al. 2003. "A Camelid Antibody Fragment Inhibits the Formation of Amyloid Fibrils by Human Lysozyme." *Nature* 424 (6950): 783–88. <https://doi.org/10.1038/nature01870>.
- Duyckaerts, C., M. Benneceb, Y. Grignon, T. Uchihara, Y. He, F. Piette, and J. J. Hauw. 1997. "Modeling the Relation between Neurofibrillary Tangles and Intellectual Status." *Neurobiology of Aging* 18 (3): 267–73.
- Duyckaerts, Charles, Heiko Braak, Jean-Pierre Brion, Luc Buée, Kelly Del Tredici, Michel Goedert, Glenda Halliday, et al. 2015. "PART Is Part of Alzheimer Disease." *Acta Neuropathologica* 129 (5): 749–56. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1390-7>.
- Eldar-Finkelman, Hagit, and Ana Martinez. 2011. "GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4 (October): 32. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00032>.
- Escobar-Khondiker, M., M. Hollerhage, M.-P. Muriel, P. Champy, A. Bach, C. Depienne, G. Respondek, et al. 2007. "Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology in Cultured Neurons." *Journal of Neuroscience* 27 (29): 7827–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1644-07.2007>.

- Fischer, Daniela, Marco D. Mukrasch, Jacek Biernat, Stefan Bibow, Martin Blackledge, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. "Conformational Changes Specific for Pseudophosphorylation at Serine 262 Selectively Impair Binding of Tau to Microtubules." *Biochemistry* 48 (42): 10047–55. <https://doi.org/10.1021/bi901090m>.
- Flaten, Vanessa, Cyril Laurent, Joana E. Coelho, Ursula Sandau, Vânia L. Batalha, Sylvie Burnouf, Malika Hamdane, et al. 2014. "From Epidemiology to Pathophysiology: What about Caffeine in Alzheimer's Disease?" *Biochemical Society Transactions* 42 (2): 587–92. <https://doi.org/10.1042/BST20130229>.
- Frank, Stephan, Brigitte Gaume, Elke S. Bergmann-Leitner, Wolfgang W. Leitner, Everett G. Robert, Frédéric Catez, Carolyn L. Smith, and Richard J. Youle. 2001. "The Role of Dynammin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis." *Developmental Cell* 1 (4): 515–25. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00055-7).
- Frappier, T. F., I. S. Georgieff, K. Brown, and M. L. Shelanski. 1994. "Tau Regulation of Microtubule-Microtubule Spacing and Bundling." *Journal of Neurochemistry* 63 (6): 2288–94.
- Fraser, Paul E. 2014. "Prions and Prion-like Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 19839–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.583492>.
- Frost, Bess, Martin Hemberg, Jada Lewis, and Mel B. Feany. 2014. "Tau Promotes Neurodegeneration through Global Chromatin Relaxation." *Nature Neuroscience* 17 (3): 357–66. <https://doi.org/10.1038/nn.3639>.
- Frost, Bess, Rachel L. Jacks, and Marc I. Diamond. 2009. "Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12845–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
- Gandhi, Neha S., Isabelle Landrieu, Cillian Byrne, Predrag Kukic, Laziza Amniai, François Xavier Cantrelle, Jean Michel Wieruszkeski, Ricardo L. Mancera, Yves Jacquot, and Guy Lippens. 2015. "A Phosphorylation-Induced Turn Defines the Alzheimer's Disease AT8 Antibody Epitope on the Tau Protein." *Angewandte Chemie - International Edition* 54 (23): 6819–23. <https://doi.org/10.1002/anie.201501898>.
- Gauthier, Serge, Howard H. Feldman, Lon S. Schneider, Gordon K. Wilcock, Giovanni B. Frisoni, Jiri H. Hardlund, Hans J. Moebius, et al. 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* 388 (10062): 2873–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31275-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31275-2).
- Giustiniani, Julien, Kevin Guillemeau, Omar Dounane, Elodie Sardin, Isabelle Huvent, Alain Schmitt, Malika Hamdane, et al. 2015. "The FK506-Binding Protein FKBP52 in Vitro Induces Aggregation of Truncated Tau Forms with Prion-like Behavior." *FASEB Journal* 29 (8): 3171–81. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268243>.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R. A. Crowther. 1989. "Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease." *Neuron* 3 (4): 519–26.
- Goedert, Michel, Masami Masuda-Suzukake, and Benjamin Falcon. 2017. "Like Prions: The Propagation of Aggregated Tau and α -Synuclein in Neurodegeneration." *Brain: A Journal of Neurology* 140 (2): 266–78. <https://doi.org/10.1093/brain/aww230>.
- Gómez de Barreda, Elena, Hana N. Dawson, Michel P. Vitek, and Jesús Avila. 2010. "Tau Deficiency Leads to the Upregulation of BAF-57, a Protein Involved in Neuron-Specific Gene Repression." *FEBS Letters* 584 (11): 2265–70. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.032>.
- Goode, B. L., P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson, and S. C. Feinstein. 1997. "Functional Interactions between the Proline-Rich and Repeat Regions of Tau Enhance Microtubule Binding and Assembly." *Molecular Biology of the Cell* 8 (2): 353–65.
- Grober, E., D. Dickson, M. J. Sliwinski, H. Buschke, M. Katz, H. Crystal, and R. B. Lipton. 1999. "Memory and Mental Status Correlates of Modified Braak Staging." *Neurobiology of Aging* 20 (6): 573–79.

- Grundke-Iqbal, I, K Iqbal, Y C Tung, M Quinlan, H M Wisniewski, and L I Binder. 1986. "Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13): 4913–17.
- Guo, Tong, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. 2017. "Roles of Tau Protein in Health and Disease." *Acta Neuropathologica* 133 (5): 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.
- Gustke, N., B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1994. "Domains of Tau Protein and Interactions with Microtubules." *Biochemistry* 33 (32): 9511–22.
- Hamdane, Malika, Anne-Véronique Sambo, Patrice Delobel, Séverine Bégard, Anne Violleau, André Delacourte, Philippe Bertrand, Jesus Benavides, and Luc Buée. 2003. "Mitotic-like Tau Phosphorylation by P25-Cdk5 Kinase Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34026–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302872200>.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman, and R. Hamers. 1993. "Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains." *Nature* 363 (6428): 446–48. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Hampel, Harald, Lon S. Schneider, Ezio Giacobini, Miia Kivipelto, Shireen Sindi, Bruno Dubois, Karl Broich, Robert Nisticò, Paul S. Aisen, and Simone Lista. 2015. "Advances in the Therapy of Alzheimer's Disease: Targeting Amyloid Beta and Tau and Perspectives for the Future." *Expert Review of Neurotherapeutics* 15 (1): 83–105. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.995637>.
- Ho, Lap, Weiping Qin, Patrick N. Pompl, Zhongmin Xiang, Jun Wang, Zhong Zhao, Yuanzhen Peng, et al. 2004. "Diet-Induced Insulin Resistance Promotes Amyloidosis in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (7): 902–4. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0978fje>.
- Hof, P. R., A. Charpiot, A. Delacourte, L. Buée, D. Purohit, D. P. Perl, and C. Bouras. 1992. "Distribution of Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in the Cerebral Cortex in Postencephalitic Parkinsonism." *Neuroscience Letters* 139 (1): 10–14.
- Hof, P. R., E. A. Nimchinsky, V. Buée-Scherrer, L. Buée, J. Nasrallah, A. F. Hottinger, D. P. Purohit, A. J. Loerzel, J. C. Steele, and A. Delacourte. 1994. "Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex of Guam: Quantitative Neuropathology, Immunohistochemical Analysis of Neuronal Vulnerability, and Comparison with Related Neurodegenerative Disorders." *Acta Neuropathologica* 88 (5): 397–404.
- Höglinger, Günter U., Annie Lannuzel, Myriam Escobar Khondiker, Patrick P. Michel, Charles Duyckaerts, Jean Féger, Pierre Champy, et al. 2005. "The Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Triggers a Cerebral Tauopathy." *Journal of Neurochemistry* 95 (4): 930–39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03493.x>.
- Höllherhage, Matthias, Andreas Matusch, Pierre Champy, Anne Lombès, Merle Ruberg, Wolfgang H. Oertel, and Günter U. Höglinger. 2009. "Natural Lipophilic Inhibitors of Mitochondrial Complex I Are Candidate Toxins for Sporadic Neurodegenerative Tau Pathologies." *Experimental Neurology* 220 (1): 133–42. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.004>.
- Holmes, Brandon B., Sarah L. DeVos, Najla Kfoury, Mei Li, Rachel Jacks, Kiran Yanamandra, Mohand O. Ouidja, et al. 2013. "Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Internalization and Propagation of Specific Proteopathic Seeds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (33): E3138–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>.
- Holmes, Brandon B., and Marc I. Diamond. 2014. "Prion-like Properties of Tau Protein: The Importance of Extracellular Tau as a Therapeutic Target." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 19855–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.549295>.
- Holtzman, David M., Maria C. Carrillo, James A. Hendrix, Lisa J. Bain, Ana M. Catafau, Laura M. Gault, Michel Goedert, et al. 2016. "Tau: From Research to Clinical Development." *Alzheimer's & Dementia* 12 (10): 1033–39. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.018>.

- Hoover, Brian R., Miranda N. Reed, Jianjun Su, Rachel D. Penrod, Linda A. Kotilinek, Marianne K. Grant, Rose Pitstick, et al. 2010. "Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration." *Neuron* 68 (6): 1067–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>.
- Hu, Wen, Xinhua Zhang, Yunn Chyn Tung, Shutao Xie, Fei Liu, and Khalid Iqbal. 2016. "Hyperphosphorylation Determines Both the Spread and the Morphology of Tau Pathology." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12 (10): 1066–77. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.014>.
- Hu, Yu, Xia-Chun Li, Zhi-hao Wang, Yu Luo, Xiangnan Zhang, Xiu-Ping Liu, Qiong Feng, et al. 2016. "Tau Accumulation Impairs Mitophagy via Increasing Mitochondrial Membrane Potential and Reducing Mitochondrial Parkin." *Oncotarget* 7 (14): 17356–68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7861>.
- Hua, Qian, and Rong Qiao He. 2003. "Tau Could Protect DNA Double Helix Structure." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1645 (2): 205–11. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00538-1](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00538-1).
- Iqbal, K., I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, P. A. Merz, G. Y. Wen, S. S. Shaikh, H. M. Wisniewski, I. Alafuzoff, and B. Winblad. 1986. "Defective Brain Microtubule Assembly in Alzheimer's Disease." *Lancet (London, England)* 2 (8504): 421–26.
- Iqbal, K., H. M. Wisniewski, M. L. Shelanski, S. Brostoff, B. H. Liwnicz, and R. D. Terry. 1974. "Protein Changes in Senile Dementia." *Brain Research* 77 (2): 337–43.
- Iqbal, Khalid, Fei Liu, and Cheng-Xin Gong. 2016. "Tau and Neurodegenerative Disease: The Story so Far." *Nature Reviews. Neurology* 12 (1): 15–27. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.225>.
- Ittner, Lars M., Yazid D. Ke, Fabien Delerue, Mian Bi, Amadeus Gladbach, Janet van Eersel, Heidrun Wölfing, et al. 2010. "Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid-Beta Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models." *Cell* 142 (3): 387–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>.
- Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, et al. 2000. "A Beta Peptide Immunization Reduces Behavioural Impairment and Plaques in a Model of Alzheimer's Disease." *Nature* 408 (6815): 979–82. <https://doi.org/10.1038/35050110>.
- Jeganathan, Sadasivam, Martin Von Bergen, Eva Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow. 2008. "The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments." *Biochemistry* 47 (40): 10526–39. <https://doi.org/10.1021/bi800783d>.
- Jho, Y. S., E. B. Zhulina, M. W. Kim, and P. A. Pincus. 2010. "Monte Carlo Simulations of Tau Proteins: Effect of Phosphorylation." *Biophysical Journal* 99 (8): 2387–97. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.056>.
- Jiao, S.-S., L.-L. Shen, C. Zhu, X.-L. Bu, Y.-H. Liu, C.-H. Liu, X.-Q. Yao, et al. 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>.
- Jimenez-Palomares, M., J. J. Ramos-Rodriguez, J. F. Lopez-Acosta, M. Pacheco-Herrero, A. M. Lechuga-Sancho, G. Perdomo, M. Garcia-Alloza, and I. Cozar-Castellano. 2012. "Increased A Production Prompts the Onset of Glucose Intolerance and Insulin Resistance." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 302 (11): E1373–80. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00500.2011>.
- Kadavath, Harindranath, Mariusz Jaremko, Łukasz Jaremko, Jacek Biernat, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2015. "Folding of the Tau Protein on Microtubules." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54 (35): 10347–51. <https://doi.org/10.1002/anie.201501714>.
- Kandimalla, Ramesh, Maria Manczak, David Fry, Yeguvapalli Suneetha, Hiromi Sesaki, and P. Hemachandra Reddy. 2016. "Reduced Dynamin-Related Protein 1 Protects against Phosphorylated Tau-Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Damage in

- Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics* 25 (22): 4881–97. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw312>.
- Kang, Jian-Sheng, Jin-Hua Tian, Ping-Yue Pan, Philip Zald, Cuiling Li, Chuxia Deng, and Zu-Hang Sheng. 2008. "Docking of Axonal Mitochondria by Syntrophin Controls Their Mobility and Affects Short-Term Facilitation." *Cell* 132 (1): 137–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.024>.
- Kar, Santwana, Juan Fan, Michael J. Smith, Michel Goedert, and Linda A. Amos. 2003. "Repeat Motifs of Tau Bind to the Insides of Microtubules in the Absence of Taxol." *The EMBO Journal* 22 (1): 70–77. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg001>.
- Katsinelos, Taxiarchis, Marcel Zeitler, Eleni Dimou, Andromachi Karakatsani, Hans-Michael Müller, Eliana Nachman, Julia P. Steringer, Carmen Ruiz de Almodovar, Walter Nickel, and Thomas R. Jahn. 2018. "Unconventional Secretion Mediates the Trans-Cellular Spreading of Tau." *Cell Reports* 23 (7): 2039–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>.
- Kaufman, Sarah K., David W. Sanders, Talitha L. Thomas, Allison Ruchinskas, Jaime Vaquer-Alicea, Apurwa M. Sharma, Timothy M. Miller, and Marc I. Diamond. 2016. "Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability in Vivo." *Neuron* 92 (4): 796–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.055>.
- Khatoun, S., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1994. "Levels of Normal and Abnormally Phosphorylated Tau in Different Cellular and Regional Compartments of Alzheimer Disease and Control Brains." *FEBS Letters* 351 (1): 80–84.
- Kim, YoungDoo, Eun Il Jeong, Jihoon Nah, Seung-Min Yoo, WonJae Lee, Youbin Kim, Seowon Moon, Se-Hoon Hong, and Yong-keun Jung. 2017. "Pimozide Reduces Toxic Forms of Tau in TauC3 Mice via AMPK-Mediated Autophagy." *Journal of Neurochemistry* 38 (1): 42–49. <https://doi.org/10.1111/jnc.14109>.
- Kimura, Tetsuya, Daniel J. Whitcomb, Jihoon Jo, Philip Regan, Thomas Piers, Seonghoo Heo, Christopher Brown, et al. 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>.
- Kolarova, Michala, Francisco García-Sierra, Ales Bartos, Jan Ricny, and Daniela Ripova. 2012. "Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease." *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012: 731526. <https://doi.org/10.1155/2012/731526>.
- Kontsekova, Eva, Norbert Zilka, Branislav Kovacech, Petr Novak, and Michal Novak. 2014. "First-in-Man Tau Vaccine Targeting Structural Determinants Essential for Pathological Tau–Tau Interaction Reduces Tau Oligomerisation and Neurofibrillary Degeneration in an Alzheimer's Disease Model." *Alzheimer's Research & Therapy* 6 (4): 44. <https://doi.org/10.1186/alzrt278>.
- Kopeikina, Katherine J., George A. Carlson, Rose Pitstick, Adam E. Ludvigson, Alan Peters, Jennifer I. Luebke, Robert M. Koffie, Matthew P. Frosch, Bradley T. Hyman, and Tara L. Spires-Jones. 2011. "Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer's Disease Brain." *The American Journal of Pathology* 179 (4): 2071–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.004>.
- Köpke, E., Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal, and I. Grundke-Iqbal. 1993. "Microtubule-Associated Protein Tau. Abnormal Phosphorylation of a Non-Paired Helical Filament Pool in Alzheimer Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (32): 24374–84.
- Lau, Dawn H. W., Marte Hogseth, Emma C. Phillips, Michael J. O'Neill, Amy M. Pooler, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. 2016. "Critical Residues Involved in Tau Binding to Fyn: Implications for Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica Communications* 4 (May). <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0317-4>.

- Laurent, C., S. Burnouf, B. Ferry, V. L. Batalha, J. E. Coelho, Y. Baqi, E. Malik, et al. 2016. "A2A Adenosine Receptor Deletion Is Protective in a Mouse Model of Tauopathy." *Molecular Psychiatry* 21 (1): 97–107. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.151>.
- Laurent, Cyril, Sabiha Eddarkaoui, Maxime Derisbourg, Antoine Leboucher, Dominique Demeyer, Sébastien Carrier, Marion Schneider, et al. 2014. "Beneficial Effects of Caffeine in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease-like Tau Pathology." *Neurobiology of Aging* 35 (9): 2079–90. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.027>.
- Lauretti, E., J. G. Li, A. Di Meco, and D. Praticò. 2017. "Glucose Deficit Triggers Tau Pathology and Synaptic Dysfunction in a Tauopathy Mouse Model." *Translational Psychiatry* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.296>.
- Lauretti, Elisabetta, and Domenico Praticò. 2015. "Glucose Deprivation Increases Tau Phosphorylation via P38 Mitogen-Activated Protein Kinase." *Aging Cell* 14 (6): 1067–74. <https://doi.org/10.1111/accel.12381>.
- Lemere, Cynthia A. 2013. "Immunotherapy for Alzheimer's Disease: Hoops and Hurdles." *Molecular Neurodegeneration* 8 (October): 36. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-36>.
- Lemere, Cynthia A., and Eliezer Masliah. 2010. "Can Alzheimer Disease Be Prevented by Amyloid- β Immunotherapy?" *Nature Reviews. Neurology* 6 (2): 108–19. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.219>.
- Li, Bin, Muhammad Omar Chohan, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2007. "Disruption of Microtubule Network by Alzheimer Abnormally Hyperphosphorylated Tau." *Acta Neuropathologica* 113 (5): 501–11. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0207-8>.
- Li, Tengfei, Jean-Pierre Bourgeois, Susanna Celli, Fabienne Glacial, Anne-Marie Le Sourd, Salah Mecheri, Babette Weksler, et al. 2016. "Cell-Penetrating Anti-GFAP VHH and Corresponding Fluorescent Fusion Protein VHH-GFP Spontaneously Cross the Blood-Brain Barrier and Specifically Recognize Astrocytes: Application to Brain Imaging." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (10): 3969–79. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201384>.
- Li, Tengfei, Matthias Vandesquille, Fani Koukouli, Clémence Dudeffant, Ihsen Youssef, Pascal Lenormand, Christelle Ganneau, et al. 2016. "Camelid Single-Domain Antibodies: A Versatile Tool for in Vivo Imaging of Extracellular and Intracellular Brain Targets." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 243 (December): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019>.
- Li, Xia-Chun, Yu Hu, Zhi-hao Wang, Yu Luo, Yao Zhang, Xiu-Ping Liu, Qiong Feng, et al. 2016. "Human Wild-Type Full-Length Tau Accumulation Disrupts Mitochondrial Dynamics and the Functions via Increasing Mitofusins." *Scientific Reports* 6 (April): 24756. <https://doi.org/10.1038/srep24756>.
- Li, Xiaoyu, Yatender Kumar, Hans Zempel, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, and Eckhard Mandelkow. 2011. "Novel Diffusion Barrier for Axonal Retention of Tau in Neurons and Its Failure in Neurodegeneration." *The EMBO Journal* 30 (23): 4825–37. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.376>.
- Licht-Murava, Avital, Rom Paz, Lilach Vaks, Limor Avrahami, Batya Plotkin, Miriam Eisenstein, and Hagit Eldar-Finkelman. 2016. "A Unique Type of GSK-3 Inhibitor Brings New Opportunities to the Clinic." *Science Signaling* 9 (454): ra110 LP-ra110. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah7102>.
- Lindwall, G., and R. D. Cole. 1984. "Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly." *The Journal of Biological Chemistry* 259 (8): 5301–5.
- Liu, Chang, and Jürgen Götz. 2013. "Profiling Murine Tau with 0N, 1N and 2N Isoform-Specific Antibodies in Brain and Peripheral Organs Reveals Distinct Subcellular Localization, with the 1N Isoform Being Enriched in the Nucleus." *PLoS ONE* 8 (12): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084849>.

- Liu, Fei, Bin Li, E.-Jan Tung, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, and Cheng-Xin Gong. 2007. "Site-Specific Effects of Tau Phosphorylation on Its Microtubule Assembly Activity and Self-Aggregation." *The European Journal of Neuroscience* 26 (12): 3429–36. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x>.
- Liu, Li, Valerie Drouet, Jessica W. Wu, Menno P. Witter, Scott A. Small, Catherine Clelland, and Karen Duff. 2012. "Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology In Vivo." *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>.
- Loomis, P A, T H Howard, R P Castleberry, and L I Binder. 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): 8422–26.
- Lovestone, Simon, Mercè Boada, Bruno Dubois, Michael Hüll, Juha O. Rinne, Hans-Jürgen Huppertz, Miguel Calero, et al. 2015. "A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 45 (1): 75–88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>.
- Lu, Yang, Hai Jin He, Jun Zhou, Jun Ye Miao, Jing Lu, Ying Ge He, Rong Pan, Yan Wei, Ying Liu, and Rong Qiao He. 2013. "Hyperphosphorylation Results in Tau Dysfunction in DNA Folding and Protection." *Journal of Alzheimer's Disease* 37 (3): 551–63. <https://doi.org/10.3233/JAD-130602>.
- Maass, Anne, Susan Landau, Suzanne L. Baker, Andy Horng, Samuel N. Lockhart, Renaud La Joie, Gil D. Rabinovici, William J. Jagust, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2017. "Comparison of Multiple Tau-PET Measures as Biomarkers in Aging and Alzheimer's Disease." *NeuroImage* 157 (August): 448–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.05.058>.
- Maina, Mahmoud Bukar, Youssra K. Al-Hilaly, and Louise C. Serpell. 2016. "Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease." *Biomolecules* 6 (1): 2–20. <https://doi.org/10.3390/biom6010009>.
- Malmqvist, Tony, Karen Anthony, and Jean-Marc Gallo. 2014. "Tau mRNA Is Present in Axonal RNA Granules and Is Associated with Elongation Factor 1A." *Brain Research* 1584 (October): 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.033>.
- Manczak, Maria, and P. Hemachandra Reddy. 2012. "Abnormal Interaction of VDAC1 with Amyloid Beta and Phosphorylated Tau Causes Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics* 21 (23): 5131–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds360>.
- Mandelkow, E. M., G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenheede, and E. Mandelkow. 1992. "Glycogen Synthase Kinase-3 and the Alzheimer-like State of Microtubule-Associated Protein Tau." *FEBS Letters* 314 (3): 315–21.
- Mandelkow, Eva Maria, Edda Thies, Bernhard Trinczek, Jacek Biernat, and Eckard Mandelkow. 2004. "MARK/PAR1 Kinase Is a Regulator of Microtubule-Dependent Transport in Axons." *Journal of Cell Biology* 167 (1): 99–110. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401085>.
- Mansuroglu, Zeyni, Houda Benhelli-Mokrani, Vasco Marcato, Audrey Sultan, Marie Violet, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, et al. 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, Elodie, Antoine Leboucher, Emilie Caron, Tariq Ahmed, Anne Tailleux, Julie Dumont, Tarik Issad, et al. 2017. "Tau Deletion Promotes Brain Insulin Resistance." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (8): 2257–69. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>.
- Mastroeni, Diego, Elaine Delvaux, Jennifer Nolz, Yuyan Tan, Andrew Grover, Salvatore Oddo, and Paul D. Coleman. 2015. "Aberrant Intracellular Localization of H3k4me3 Demonstrates an Early Epigenetic Phenomenon in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 36 (12): 3121–29. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.017>.
- Matsumoto, Shin-Ei, Yumiko Motoi, Koichi Ishiguro, Takeshi Tabira, Fuyuki Kametani, Masato Hasegawa, and Nobutaka Hattori. 2015. "The Twenty-Four KDa C-Terminal

- Tau Fragment Increases with Aging in Tauopathy Mice: Implications of Prion-like Properties.” *Human Molecular Genetics* 24 (22): 6403–16. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv351>.
- Melis, Valeria, Mandy Magbagbeolu, Janet E. Rickard, David Horsley, Kathleen Davidson, Kathleen A. Harrington, Keith Goatman, et al. 2015. “Effects of Oxidized and Reduced Forms of Methylthioninium in Two Transgenic Mouse Tauopathy Models.” *Behavioural Pharmacology* 26 (4): 353–68. <https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000133>.
- Metuzals, Jams, Yves Robitaille, Susan Houghton, Serge Gauthier, and Richard Leblanc. 1988. “Paired Helical Filaments and the Cytoplasmic-Nuclear Interface in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Neurocytology* 17 (6): 827–33. <https://doi.org/10.1007/BF01216709>.
- Mirbaha, Hilda, Brandon B. Holmes, David W. Sanders, Jan Bieschke, and Marc I. Diamond. 2015. “Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (24): 14893–903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652693>.
- Mondragón-Rodríguez, Siddhartha, Emilie Trillaud-Doppia, Anthony Dudilot, Catherine Bourgeois, Michel Lauzon, Nicole Leclerc, and Jannic Boehm. 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): 32040–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>.
- Morgan, D., D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, et al. 2000. “A Beta Peptide Vaccination Prevents Memory Loss in an Animal Model of Alzheimer’s Disease.” *Nature* 408 (6815): 982–85. <https://doi.org/10.1038/35050116>.
- Mosconi, Lisa, Alberto Pupi, and Mony J. De Leon. 2008. “NIH Public Access.” *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 1147 (4): 180–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.007.Brain>.
- Mukrasch, Marco D., Stefan Bibow, Jegannath Korukottu, Sadasivam Jeganathan, Jacek Biernat, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. “Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution.” *PLoS Biology* 7 (2): 0399–0414. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>.
- Muntané, G., E. Dalfó, A. Martinez, and I. Ferrer. 2008. “Phosphorylation of Tau and Alpha-Synuclein in Synaptic-Enriched Fractions of the Frontal Cortex in Alzheimer’s Disease, and in Parkinson’s Disease and Related Alpha-Synucleinopathies.” *Neuroscience* 152 (4): 913–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.030>.
- Myeku, Natura, Catherine L. Clelland, Sheina Emrani, Nikolay V. Kukushkin, Wai Haung Yu, Alfred L. Goldberg, and Karen E. Duff. 2015. “Tau-Driven 26S Proteasome Impairment and Cognitive Dysfunction Can Be Prevented Early in Disease by Activating CAMP-PKA Signaling.” *Nature Medicine* 6 (December): 1–11. <https://doi.org/10.1038/nm.4011>.
- Narendra, Derek P., Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der Fen Suen, Clement A. Gautier, Jie Shen, Mark R. Cookson, and Richard J. Youle. 2010. “PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin.” *PLoS Biology* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>.
- Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der Fen Suen, and Richard J. Youle. 2008. “Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy.” *Journal of Cell Biology* 183 (5): 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>.
- Nelson, Peter T., Irina Alafuzoff, Eileen H. Bigio, Constantin Bouras, Heiko Braak, Nigel J. Cairns, Rudolph J. Castellani, et al. 2012. “Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71 (5): 362–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.
- Noble, Wendy, Emmanuel Planel, Cindy Zehr, Vicki Olm, Jordana Meyerson, Farhana Suleman, Kate Gaynor, et al. 2005. “Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Lithium Correlates with Reduced Tauopathy and Degeneration in Vivo.” *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (19): 6990–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500466102>.
- Oddo, Salvatore, Vitaly Vasilevko, Antonella Caccamo, Masashi Kitazawa, David H. Cribbs, and Frank M. LaFerla. 2006. “Reduction of Soluble Abeta and Tau, but Not Soluble Abeta Alone, Ameliorates Cognitive Decline in Transgenic Mice with Plaques and Tangles.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (51): 39413–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608485200>.
- Opattova, Alena, Martin Cente, Michal Novak, and Peter Filipcik. 2015. “The Ubiquitin Proteasome System as a Potential Therapeutic Target for Treatment of Neurodegenerative Diseases.” *Gen. Physiol. Biophys* 34: 337–52. https://doi.org/10.4149/gpb_2015024.
- Orgogozo, J.-M., S. Gilman, J.-F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, et al. 2003. “Subacute Meningoencephalitis in a Subset of Patients with AD after Abeta42 Immunization.” *Neurology* 61 (1): 46–54.
- Orr, Anna G., Edward C. Hsiao, Max M. Wang, Kaitlyn Ho, Daniel H. Kim, Xin Wang, Weikun Guo, et al. 2015. “Astrocytic Adenosine Receptor A2A and Gs-Coupled Signaling Regulate Memory.” *Nature Neuroscience* 18 (3): 423–34. <https://doi.org/10.1038/nn.3930>.
- Ott, A., R. P. Stolk, F. van Harskamp, H. A. P. Pols, A. Hofman, and M. M. B. Breteler. 1999. “Diabetes Mellitus and the Risk of Dementia: The Rotterdam Study.” *Neurology* 53 (9): 1937–1937. <https://doi.org/10.1212/WNL.53.9.1937>.
- Oyama, Fumitaka, Svetlana Kotliarova, Akihiro Harada, Mamoru Ito, Haruko Miyazaki, Yoshito Ueyama, Nobutaka Hirokawa, Nobuyuki Nukina, and Yasuo Ihara. 2004. “Gem GTPase and Tau: Morphological Changes Induced by Gem GTPase in CHO Cells Are Antagonized by Tau.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27272–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401634200>.
- Panda, Dulal, Jonathan C. Samuel, Michelle Massie, Stuart C. Feinstein, and Leslie Wilson. 2003. “Differential Regulation of Microtubule Dynamics by Three- and Four-Repeat Tau: Implications for the Onset of Neurodegenerative Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9548–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633508100>.
- Pandey, Mukesh K., and Timothy R. DeGrado. 2016. “Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Targeted Therapy and Imaging.”
- Panza, Francesco, Vincenzo Solfrizzi, Davide Seripa, Bruno P. Imbimbo, Madia Lozupone, Andrea Santamato, Rosanna Tortelli, et al. 2016. “Tau-Based Therapeutics for Alzheimer’s Disease: Active and Passive Immunotherapy.” *Immunotherapy* 8 (9): 1119–34. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0019>.
- Perez, Mar, Ismael Santa-Maria, Elena Gomez De Barreda, Xiongwei Zhu, Raquel Cuadros, Jose Roman Cabrero, Francisco Sanchez-Madrid, et al. 2009. “Tau - An Inhibitor of Deacetylase HDAC6 Function.” *Journal of Neurochemistry* 109 (6): 1756–66. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x>.
- Petrucelli, Leonard, Dennis Dickson, Kathryn Kehoe, Julie Taylor, Heather Snyder, Andrew Grover, Michael De Lucia, et al. 2004. “CHIP and Hsp70 Regulate Tau Ubiquitination, Degradation and Aggregation.” *Human Molecular Genetics* 13 (7): 703–14. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh083>.
- Phiel, Christopher J., Christina A. Wilson, Virginia M.-Y. Lee, and Peter S. Klein. 2003. “GSK-3alpha Regulates Production of Alzheimer’s Disease Amyloid-Beta Peptides.” *Nature* 423 (lane 2): 435–39. <https://doi.org/10.1038/nature01640>.
- Pickhardt, Marcus, Zuzana Gazova, Martin von Bergen, Inna Khlistunova, Yipeng Wang, Antje Hascher, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, and Eckhard Mandelkow. 2005. “Anthraquinones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Alzheimer’s Paired Helical Filaments in Vitro and in Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (5): 3628–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410984200>.
- Pickhardt, Marcus, Gregor Larbig, Inna Khlistunova, Atilla Coksezen, Bernd Meyer, Eva-Maria Mandelkow, Boris Schmidt, and Eckhard Mandelkow. 2007. “Phenylthiazolyl-

- Hydrazide and Its Derivatives Are Potent Inhibitors of Tau Aggregation and Toxicity in Vitro and in Cells.” *Biochemistry* 46 (35): 10016–23. <https://doi.org/10.1021/bi700878g>.
- Pilling, Aaron D., Dai Horiuchi, Curtis M. Lively, and William M. Saxton. 2006. “Kinesin-1 and Dynein Are the Primary Motors for Fast Transport of Mitochondria in Drosophila Motor Axons.” *Molecular Biology of the Cell* 17 (4): 2057–68. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0526>.
- Pinheiro, Sara, Joana Silva, Cristina Mota, João Vaz-Silva, Ana Veloso, Vítor Pinto, Nuno Sousa, João Cerqueira, and Ioannis Sotiropoulos. 2016. “Tau Mislocation in Glucocorticoid-Triggered Hippocampal Pathology.” *Molecular Neurobiology* 53 (7): 4745–53. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9356-2>.
- Planel, E. 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): 2401–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5561-03.2004>.
- Pooler, Amy M, Emma C Phillips, Dawn H W Lau, Wendy Noble, and Diane P Hanger. 2013. “Physiological Release of Endogenous Tau Is Stimulated by Neuronal Activity.” *EMBO Reports* 14 (4): 389–94. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.15>.
- Prince, Martin J., A Commas-Herrera, M Knapp, M Guerchet, and M Karagiannidou. 2016. “World Alzheimer Report 2016 - Improving Healthcare for People Living with Dementia: Coverage, Quality and Costs Now and in the Future.” September 20, 2016. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>.
- Qi, Haoling, François-Xavier Cantrelle, Houda Benhelli-Mokrani, Caroline Smet-Nocca, Luc Buée, Guy Lippens, Eliette Bonnefoy, Marie-Christine Galas, and Isabelle Landrieu. 2015. “Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation.” *Biochemistry* 54 (7): 1525–33. <https://doi.org/10.1021/bi5014613>.
- Rapoport, Mark, Hana N. Dawson, Lester I. Binder, Michael P. Vitek, and Adriana Ferreira. 2002. “Tau Is Essential to Beta -Amyloid-Induced Neurotoxicity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6364–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.092136199>.
- Regan, Philip, Thomas Piers, Jee-Hyun Yi, Dong-Hyun Kim, Seonghoo Huh, Se Jin Park, Jong Hoon Ryu, Daniel J. Whitcomb, and Kwangwook Cho. 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): 4804–12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015>.
- Roberson, Erik D., Kimberly Scarce-Levie, Jorge J. Palop, Fengrong Yan, Irene H. Cheng, Tiffany Wu, Hilary Gerstein, Gui-Qiu Yu, and Lennart Mucke. 2007. “Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid Beta-Induced Deficits in an Alzheimer’s Disease Mouse Model.” *Science (New York, N.Y.)* 316 (5825): 750–54. <https://doi.org/10.1126/science.1141736>.
- Rodríguez-Martín, Teresa, Amy M. Pooler, Dawn H. W. Lau, Gábor M. Mórotz, Kurt J. De Vos, Jonathan Gilley, Michael P. Coleman, and Diane P. Hanger. 2016. “Reduced Number of Axonal Mitochondria and Tau Hypophosphorylation in Mouse P301L Tau Knockin Neurons.” *Neurobiology of Disease* 85: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.007>.
- Rogers, Madolyn Bowman. 2018. “To Block Tau’s Proteopathic Spread, Antibody Must Attack Its Mid-Region.” In . Alzforum. <https://www.alzforum.org/news/conference-coverage/block-taus-proteopathic-spread-antibody-must-attack-its-mid-region>.
- Rossi, Giacomina, Donatella Conconi, Elena Panzeri, Serena Redaelli, Elena Piccoli, Laura Paoletta, Leda Dalprà, and Fabrizio Tagliavini. 2013. “Mutations in MAPT Gene Cause Chromosome Instability and Introduce Copy Number Variations Widely in the Genome.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 33 (4): 969–82. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121633>.

- Rutgers, K. S., R. J. A. Nabuurs, S. a. A. van den Berg, G. J. Schenk, M. Rotman, C. T. Verrips, S. G. van Duinen, et al. 2011. "Transmigration of Beta Amyloid Specific Heavy Chain Antibody Fragments across the in Vitro Blood-Brain Barrier." *Neuroscience* 190 (September): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.076>.
- Ruthel, Gordon, and Peter J. Hollenbeck. 2003. "Response of Mitochondrial Traffic to Axon Determination and Differential Branch Growth." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (24): 8618–24. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2324-03.2003> [pii].
- Salloway, Stephen, Reisa Sperling, Nick C. Fox, Kaj Blennow, William Klunk, Murray Raskind, Marwan Sabbagh, et al. 2014. "Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 370 (4): 322–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304839>.
- Saman, Sudad, WonHee Kim, Mario Raya, Yvonne Visnick, Suhad Miro, Sarmad Saman, Bruce Jackson, et al. 2012. "Exosome-Associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (6): 3842–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277061>.
- Sanders, David W., Sarah K. Kaufman, Sarah L. DeVos, Apurwa M. Sharma, Hilda Mirbaha, Aimin Li, Scarlett J. Barker, et al. 2014. "Distinct Tau Prion Strains Propagate in Cells and Mice and Define Different Tauopathies." *Neuron* 82 (6): 1271–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>.
- Santarella, Rachel A., Georgios Skiniotis, Kenneth N. Goldie, Peter Tittmann, Heinz Gross, Eva-Maria Mandelkow, E. Mandelkow, and Andreas Hoenger. 2004. "Surface-Decoration of Microtubules by Human Tau." *Journal of Molecular Biology* 339 (3): 539–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.008>.
- Saxton, W. M., and P. J. Hollenbeck. 2012. "The Axonal Transport of Mitochondria." *Journal of Cell Science* 125 (9): 2095–2104. <https://doi.org/10.1242/jcs.053850>.
- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, et al. 1999. "Immunization with Amyloid-Beta Attenuates Alzheimer-Disease-like Pathology in the PDAPP Mouse." *Nature* 400 (6740): 173–77. <https://doi.org/10.1038/22124>.
- Schwalbe, Martin, Harindranath Kadavath, Jacek Biernat, Valery Ozenne, Martin Blackledge, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2015. "Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231." *Structure* 23 (8): 1448–58. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.002>.
- Schwarz, Adam J., Peng Yu, Bradley B. Miller, Sergey Shcherbinin, James Dickson, Michael Navitsky, Abhinay D. Joshi, Michael D. Devous, and Mark S. Mintun. 2016. "Regional Profiles of the Candidate Tau PET Ligand 18F-AV-1451 Recapitulate Key Features of Braak Histopathological Stages." *Brain: A Journal of Neurology* 139 (Pt 5): 1539–50. <https://doi.org/10.1093/brain/aww023>.
- Seitz-Tutter, D., G. M. Langford, and D. G. Weiss. 1988. "Dynamic Instability of Native Microtubules from Squid Axons Is Rare and Independent of Gliding and Vesicle Transport." *Experimental Cell Research* 178 (2): 504–12.
- Sengupta, A., J. Kabat, M. Novak, Q. Wu, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1998. "Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357 (2): 299–309. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0813>.
- Sergeant, N., A. Watzek, and A. Delacourte. 1999. "Neurofibrillary Degeneration in Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration: Tau Pathologies with Exclusively 'Exon 10' Isoforms." *Journal of Neurochemistry* 72 (3): 1243–49.
- Sergeant, Nicolas, Alexis Bretteville, Malika Hamdane, Marie-Laure Caillet-Boudin, Pierre Grognet, Stephanie Bombois, David Blum, et al. 2008. "Biochemistry of Tau in Alzheimer's Disease and Related Neurological Disorders." *Expert Review of Proteomics* 5 (2): 207–24. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.2.207>.

- Shipton, Olivia A., Julie R. Leitz, Jenny Dworzak, Christine E. J. Acton, Elizabeth M. Tunbridge, Franziska Denk, Hana N. Dawson, et al. 2011. "Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (5): 1688–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2610-10.2011>.
- Sibille, Nathalie, Isabelle Huvent, Caroline Fauquant, Dries Verdegem, Laziza Amniai, Arnaud Leroy, Jean Michel Wieruszeski, Guy Lippens, and Isabelle Landrieu. 2012. "Structural Characterization by Nuclear Magnetic Resonance of the Impact of Phosphorylation in the Proline-Rich Region of the Disordered Tau Protein." *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 80 (2): 454–62. <https://doi.org/10.1002/prot.23210>.
- Sjoberg, M. K. 2006. "Tau Protein Binds to Pericentromeric DNA: A Putative Role for Nuclear Tau in Nucleolar Organization." *Journal of Cell Science* 119 (10): 2025–34. <https://doi.org/10.1242/jcs.02907>.
- Snow, A. D., T. N. Wight, D. Nochlin, Y. Koike, K. Kimata, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 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* 63 (5): 601–11.
- Sokolow, Sophie, Kristen M. Henkins, Tina Bilousova, Bianca Gonzalez, Harry V. Vinters, Carol A. Miller, Lindsey Cornwell, Wayne W. Poon, and Karen H. Gylys. 2015. "Pre-Synaptic C-Terminal Truncated Tau Is Released from Cortical Synapses in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 133 (3): 368–79. <https://doi.org/10.1111/jnc.12991>.
- Spillantini, M. G., T. D. Bird, and B. Ghetti. 1998. "Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17: A New Group of Tauopathies." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 8 (2): 387–402.
- Spillantini, Maria Grazia, and Michel Goedert. 2013. "Tau Pathology and Neurodegeneration." *The Lancet. Neurology* 12 (6): 609–22. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).
- Spillantini, Maria Grazia, Jill R. Murrell, Michel Goedert, Martin R. Farlow, Aaron Klug, and Bernardino Ghetti. 1998. "Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13): 7737–41.
- Spires-Jones, Tara L., and Bradley T. Hyman. 2014. "The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease." *Neuron* 82 (4): 756–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>.
- Sultan, Audrey, Fabrice Nessler, Marie Violet, Séverine Bégard, Anne Loyens, Smail Talahari, Zeyni Mansuroglu, et al. 2011. "Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection." *Journal of Biological Chemistry* 286 (6): 4566–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>.
- Sun, Tao, Haifa Qiao, Ping Yue Pan, Yanmin Chen, and Zu Hang Sheng. 2013. "Motile Axonal Mitochondria Contribute to the Variability of Presynaptic Strength." *Cell Reports* 4 (3): 413–19. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.040>.
- Suzuki, Mamiko, and Tetsuya Kimura. 2017. "Microtubule-Associated Tau Contributes to Intra-Dendritic Trafficking of AMPA Receptors in Multiple Ways." *Neuroscience Letters* 653 (July): 276–82. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.056>.
- Tai, Hwan-Ching, Alberto Serrano-Pozo, Tadafumi Hashimoto, Matthew P. Frosch, Tara L. Spires-Jones, and Bradley T. Hyman. 2012. "The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is Associated with Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System." *The American Journal of Pathology* 181 (4): 1426–35. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.033>.
- Takahashi, Reisuke H., Estibaliz Capetillo-Zarate, Michael T. Lin, Teresa A. Milner, and Gunnar K. Gouras. 2010. "Co-Occurrence of Alzheimer's Disease β -Amyloid and τ

- Pathologies at Synapses.” *Neurobiology of Aging* 31 (7): 1145–52. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.021>.
- Tardivel, Meryem, Séverine Bégard, Luc Bousset, Simon Dujardin, Audrey Coens, Ronald Melki, Luc Buée, and Morvane Colin. 2016. “Tunneling Nanotube (TNT)-Mediated Neuron-to Neuron Transfer of Pathological Tau Protein Assemblies.” *Acta Neuropathologica Communications* 4 (November). <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>.
- Tashiro, K., M. Hasegawa, Y. Ihara, and T. Iwatsubo. 1997. “Somatodendritic Localization of Phosphorylated Tau in Neonatal and Adult Rat Cerebral Cortex.” *Neuroreport* 8 (12): 2797–2801.
- Tatebayashi, Yoshitaka, Niloufar Haque, Yunn-Chyn Tung, Khalid Iqbal, and Inge Grundke-Iqbal. 2004. “Role of Tau Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 β in the Regulation of Organelle Transport.” *Journal of Cell Science* 117 (9): 1653–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.01018>.
- Temido-Ferreira, Mariana, Diana G. Ferreira, Vânia L. Batalha, Inês Marques-Morgado, Joana E. Coelho, Pedro Pereira, Rui Gomes, et al. 2018. “Age-Related Shift in LTD Is Dependent on Neuronal Adenosine A2A Receptors Interplay with mGluR5 and NMDA Receptors.” *Molecular Psychiatry*, June. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0110-9>.
- Teune, Laura K., Anna L. Bartels, Bauke M. de Jong, Antoon T. M. Willemsen, Silvia A. Eshuis, Jeroen J. de Vries, Joost C. H. van Oostrom, and Klaus L. Leenders. 2010. “Typical Cerebral Metabolic Patterns in Neurodegenerative Brain Diseases.” *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 25 (14): 2395–2404. <https://doi.org/10.1002/mds.23291>.
- Theunis, Clara, Natalia Crespo-Biel, Valérie Gafner, Maria Pihlgren, María Pilar López-Deber, Pedro Reis, David T. Hickman, et al. 2013. “Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy.” *PLoS ONE* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072301>.
- Thornton, Claire, Nicola J. Bright, Magdalena Sastre, Phillip J. Muckett, and David Carling. 2011. “AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is a Tau Kinase, Activated in Response to Amyloid β -Peptide Exposure.” *Biochemical Journal* 434 (3): 503–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20101485>.
- Tiwari, Sachin S., Marie d’Orange, Claire Troakes, Badrun N. Shurovi, Olivia Engmann, Wendy Noble, Tibor Hortobágyi, and Karl P. Giese. 2015. “Evidence That the Presynaptic Vesicle Protein CSPalpha Is a Key Player in Synaptic Degeneration and Protection in Alzheimer’s Disease.” *Molecular Brain* 8 (January): 6. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0096-z>.
- Tracy, Tara E., Peter Dongmin Sohn, S. Sakura Minami, Chao Wang, Sang-Won Min, Yaqiao Li, Yungui Zhou, et al. 2016. “Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss.” *Neuron* 90 (2): 245–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.005>.
- Trinczek, B., J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. “Domains of Tau Protein, Differential Phosphorylation, and Dynamic Instability of Microtubules.” *Molecular Biology of the Cell* 6 (12): 1887–1902.
- Troquier, Laetitia, Raphaëlle Caillierez, Sylvie Burnouf, Francisco J. Fernandez-Gomez, Marie-Eve Grosjean, Nadege Zommer, Nicolas Sergeant, Susanna Schraen-Maschke, David Blum, and Luc Buee. 2012. “Targeting Phospho-Ser422 by Active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 Mouse Model: A Suitable Therapeutic Approach.” *Current Alzheimer Research* 9 (4): 397–405.
- Tseng, Bertrand P., Kim N. Green, Julie L. Chan, Mathew Blurton-Jones, and Frank M. LaFerla. 2008. “A β Inhibits the Proteasome and Enhances Amyloid and Tau Accumulation.” *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1607–18. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014>.
- Tsuboi, Yoshio, Katsumi Doh-Ura, and Tatsuo Yamada. 2009. “Continuous Intraventricular Infusion of Pentosan Polysulfate: Clinical Trial against Prion Diseases.”

- Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 29 (5): 632–36. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2009.01058.x>.
- Vingtdeux, Valérie, Peter Davies, Dennis W. Dickson, and Philippe Marambaud. 2011. “AMPK Is Abnormally Activated in Tangle-and Pre-Tangle-Bearing Neurons in Alzheimer’s Disease and Other Tauopathies.” *Acta Neuropathologica* 121 (3): 337–49. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0759-x>.
- Violet, Marie, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Meliza Sendid Chouala, Audrey Sultan, Elodie Marciniak, et al. 2015. “Prefibrillar Tau Oligomers Alter the Nucleic Acid Protective Function of Tau in Hippocampal Neurons in Vivo.” *Neurobiology of Disease* 82: 540–51. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.003>.
- Violet, Marie, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Raphaëlle Caillierez, Smail Talahari, et al. 2014. “A Major Role for Tau in Neuronal DNA and RNA Protection in Vivo under Physiological and Hyperthermic Conditions.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (March). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>.
- Wan, Q., Z. G. Xiong, H. Y. Man, C. A. Ackerley, J. Braunton, W. Y. Lu, L. E. Becker, J. F. MacDonald, and Y. T. Wang. 1997. “Recruitment of Functional GABA(A) Receptors to Postsynaptic Domains by Insulin.” *Nature* 388 (6643): 686–90. <https://doi.org/10.1038/41792>.
- Wang, Jian Zhi, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 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, Yipeng, and Eckhard Mandelkow. 2016. “Tau in Physiology and Pathology.” *Nature Reviews. Neuroscience* 17 (1): 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>.
- Wei, Yan, Mei Hua Qu, Xing Sheng Wang, Lan Chen, Dong Liang Wang, Ying Liu, Qian Hua, and Rong Qiao He. 2008. “Binding to the Minor Groove of the Double-Strand, Tau Protein Prevents DNA Damage by Peroxidation.” *PLoS ONE* 3 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002600>.
- Wei, Yu Ping, Jin Wang Ye, Xiong Wang, Li Ping Zhu, Qing Hua Hu, Qun Wang, Dan Ke, Qing Tian, and Jian Zhi Wang. 2018. “Tau-Induced Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-IV Activation Aggravates Nuclear Tau Hyperphosphorylation.” *Neuroscience Bulletin* 34 (2): 261–69. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0148-8>.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. “A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858–62.
- Werth, J. L., and S. A. Thayer. 1994. “Mitochondria Buffer Physiological Calcium Loads in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (1): 348–56.
- Wilcock, G. K., and M. M. Esiri. 1982. “Plaques, Tangles and Dementia. A Quantitative Study.” *Journal of the Neurological Sciences* 56 (2–3): 343–56.
- Wischik, C. M., P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth, and C. R. Harrington. 1996. “Selective Inhibition of Alzheimer Disease-like Tau Aggregation by Phenothiazines.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 11213–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11213>.
- Wischik, Claude M., Roger T. Staff, Damon J. Wischik, Peter Bentham, Alison D. Murray, John M. D. Storey, Karin A. Kook, and Charles R. Harrington. 2015. “Tau Aggregation Inhibitor Therapy: An Exploratory Phase 2 Study in Mild or Moderate Alzheimer’s Disease.” *Journal of Alzheimer’s Disease* 44 (2): 705–20. <https://doi.org/10.3233/JAD-142874>.
- Witman, G. B., D. W. Cleveland, M. D. Weingarten, and M. W. Kirschner. 1976. “Tubulin Requires Tau for Growth onto Microtubule Initiating Sites.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (11): 4070–74.
- Wu, Jessica W., Mathieu Herman, Li Liu, Sabrina Simoes, Christopher M. Acker, Helen Figueroa, Joshua I. Steinberg, et al. 2013. “Small Misfolded Tau Species Are Internalized via Bulk Endocytosis and Anterogradely and Retrogradely Transported

- in Neurons.” *The Journal of Biological Chemistry* 288 (3): 1856–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528>.
- Wu, Jessica W., Syed A. Hussaini, Isle M. Bastille, Gustavo A. Rodriguez, Ana Mrejeru, Kelly Rilett, David W. Sanders, et al. 2016. “Neuronal Activity Enhances Tau Propagation and Tau Pathology in Vivo.” *Nature Neuroscience* 19 (8): 1085–92. <https://doi.org/10.1038/nn.4328>.
- Yagishita, Sosuke, Miyuki Murayama, Tomoe Ebihara, Kei Maruyama, and Akihiko Takashima. 2015. “Glycogen Synthase Kinase 3 β -Mediated Phosphorylation in the Most C-Terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (49): 29438–48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619668>.
- Yamada, Elizabeth S., Gesine Respondek, Stefanie Müssner, Anderson de Andrade, Matthias Höllherhage, Christel Depienne, Agnès Rastetter, et al. 2014. “Annonacin, a Natural Lipophilic Mitochondrial Complex I Inhibitor, Increases Phosphorylation of Tau in the Brain of FTDP-17 Transgenic Mice.” *Experimental Neurology* 253: 113–25. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.017>.
- Yamada, K. M., B. S. Spooner, and N. K. Wessells. 1970. “Axon Growth: Roles of Microfilaments and Microtubules.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66 (4): 1206–12.
- Yamada, Kaoru, Jerrah K. Holth, Fan Liao, Floy R. Stewart, Thomas E. Mahan, Hong Jiang, John R. Cirrito, et al. 2014. “Neuronal Activity Regulates Extracellular Tau in Vivo.” *The Journal of Experimental Medicine* 211 (3): 387–93. <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>.
- Yanamandra, Kiran, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2015. “Anti-Tau Antibody Reduces Insoluble Tau and Decreases Brain Atrophy.” *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2 (3): 278–88. <https://doi.org/10.1002/acn3.176>.
- Yanamandra, Kiran, Najla Kfoury, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Shengmei Ma, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2013. “Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding in Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition in Vivo.” *Neuron* 80 (2): 402–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.046>.
- Youle, Richard J., and Derek P. Narendra. 2011. “Mechanisms of Mitophagy.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (1): 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>.
- Zempel, Hans, and Eva-Maria Mandelkow. 2015. “Tau Missorting and Spastin-Induced Microtubule Disruption in Neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia.” *Molecular Neurodegeneration* 10 (December). <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0064-1>.
- Zempel, Hans, Edda Thies, Eckhard Mandelkow, and Eva-Maria Mandelkow. 2010. “Abeta Oligomers Cause Localized Ca(2+) Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (36): 11938–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010>.
- Zhang, Zhong-hao, Qiu-yan Wu, Rui Zheng, Chen Chen, Yao Chen, Qiong Liu, Peter R. Hoffmann, Jia-zuan Ni, and Guo-Li Song. 2017. “Selenomethionine Mitigates Cognitive Decline by Targeting Both Tau Hyperphosphorylation and Autophagic Clearance in an Alzheimer’s Disease Mouse Model.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (9): 3229–16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3229-16.2017>.
- Ziviani, E., R. N. Tao, and A. J. Whitworth. 2010. “Drosophila Parkin Requires PINK1 for Mitochondrial Translocation and Ubiquitinates Mitofusin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (11): 5018–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913485107>.