

Université de Lille

Ecole Gradué Biologie-Santé de Lille (446)

THESE

Présentée par

Raphaëlle Caillierez

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité Neurosciences

Les VHHs en tant qu'outils thérapeutiques dans des modèles de tauopathies

Soutenue publiquement le 6 novembre 2025 devant le jury composé de :

Dr. Mireille Dumoulin

Dr. Benjamin Dehay

Pr. Karelle Leroy

Dr. Pierre Dourlen

Dr. Luc Buée

Dr. Morvane Colin

Rapporteure

Rapporteur

Présidente du jury

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci aux Dr. **Mireille Dumoulin** et Dr. **Benjamin Dehay** d'avoir consenti d'être rapporteur de ce manuscrit. Votre expertise me permettra de finaliser ce projet avec des recommandations de qualité. Je remercie également le Pr. **Karelle Leroy** et le Dr. **Pierre Dourlen** de faire partie de ce jury mais également de mon CSI. Leurs précieux conseils et leur bienveillance m'ont permis d'avancer à chaque étape. J'ai beaucoup apprécié nos échanges.

Je remercie le Dr. **Luc Buée** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet mais également beaucoup d'autres depuis ces presque 20 ans de collaboration. Je réussis encore à vous surprendre ! Je vous remercie pour votre soutien, votre écoute et vos conseils.

Un énorme merci au Dr. **Morvane Colin**. J'ai commencé la recherche avec toi et tu m'as tout de suite transmis ta passion pour ce métier pas comme les autres. Ta gentillesse, ton humour et ton respect nous ont permis de travailler ensemble toutes ces années. Ta rigueur, ton intégrité, ton goût pour la transmission et ta qualité scientifique ont fait de toi la directrice de thèse idéale. Je suis fière d'être « la dernière » de tes étudiantes. Je te souhaite une belle deuxième vie pleine de sérénité et de sommeil.

Je remercie la « VHH team ». Merci au Dr. **Isabelle Landrieu** pour ses encouragements et nos échanges scientifiques qui pourront continuer je l'espère. Et merci de m'avoir laissée jouer avec tes bébés les VHHs. Merci au Dr. **Clément Danis** pour son aide et sa disponibilité pour toutes mes questions de biochimie et de bibliographie. Tu es officiellement mon wikiVHH et je te remercie pour ta patience. Merci également au Dr. **Elian Dupré** et à **Justine Mortelecque** avec qui c'est un vrai plaisir de collaborer depuis le début de l'aventure VHH.

Je remercie grandement **Sarah Leclercq** pour son aide précieuse. Tu as travaillé dur sur ce projet et avec une grande qualité. J'ai beaucoup apprécié nos échanges professionnels ou informels. Tu es un grand atout pour l'équipe, et en plus tu organises des apéros ! Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière, mais d'abord profite de ton voyage à l'autre bout de la terre.

Merci à celles qui sont plus que des collègues et des colocs de bureau : **Séverine** et **Sabiha**. Dans le cadre de ma thèse, je vous remercie pour votre aide grâce à vos immenses compétences techniques mais je voudrais surtout vous remercier pour votre aide morale. Merci de supporter mon stress, mes idées folles, mes craquages, mon bazar et mes blagues pourries au quotidien. Je vous adore, j'espère

qu'on restera « la team » peu importe notre avenir professionnel. Merci aussi à **Emilie** pour son écoute, son soutien et les verres de décompression (pas assez nombreux).

Je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe A&T. Notamment les ITAs, qui font avancer les nombreux projets et mettent une bonne ambiance au quotidien : **Camille, Brenda, Espérance, Sébastien** (qui a désormais le plus grand labo du monde) entre autres. Merci aussi aux chercheurs de l'équipe qui ont toujours été disponibles et de bons conseils : **David, Nicolas, Malika, Vincent, Valérie** et **Sophie**.

Je remercie aussi les autres doctorants de l'équipe qui m'ont soutenue malgré nos différences de parcours (et d'âge). Merci **Marie, Agathe, Rislane** et **Claire**. Et bonne chance à **Giovanni**, mon 'padawan' qui réussit à me supporter comme formatrice et continue ce projet plein d'espoir.

Merci également à toutes les personnes travaillant pour le commun qui nous permettent d'avoir des prestations ou du matériel de qualité. D'abord, le secrétariat : **Sophie**, qui est ma petite maman du labo, **Céline, Nathalie** et **Marion**. Mais aussi les plateformes technologiques : je remercie tout le personnel des animaleries EOPS et DHURE et plus particulièrement **Mélanie** pour toutes ces chirurgies ensemble. La plate-forme LIIFE : **Florent, Clémence, Nicolas** et **Yann** qui m'ont permis de découvrir le monde de l'imagerie qui est passionnant ; encore plus dans un château en Espagne. Je remercie aussi la plate-forme BiCel, notamment **Antonino** le pro des macros et **Nathalie**.

Toutes mes années dans le laboratoire A&T m'ont permis de croiser la route de nombreuses personnes qui m'ont apportées des compétences techniques ou humaines. Ne pouvant pas les nommer toutes, je pense néanmoins beaucoup à elles.

Je remercie aussi ma famille et mes amis qui me soutiennent dans toutes mes épreuves et qui écoutent mes palabres scientifiques sans se plaindre. Merci à **mon père** pour son écoute et son amour. Merci à **ma mère** qui sans le savoir m'a motivée à faire ce projet et m'a donnée un peu de sa force légendaire. Merci à **Véronique** pour la relecture qui n'a pas dû être facile. Et merci à **Rachel** et **Colette** qui se sont vraiment battues contre les tauopathies.

Et surtout merci à **Alex** qui me soutient et me supporte depuis tout ce temps. J'espère t'apporter au moins autant. Et merci à mes enfants **Victor** et **Lilian**. Vous êtes le moteur de ma vie, c'est aussi pour vous que je réalise ce projet, pour vous montrer qu'il n'est jamais trop tard et qu'il faut croire en soi. Merci infiniment à tous les trois.

RESUME

Les tauopathies sont un groupe de maladies neurodégénératives hétérogènes ayant pour caractéristique commune une accumulation intracellulaire d'agrégats composés de protéine tau. Dans la maladie d'Alzheimer, la pathologie tau évolue selon une progression stéréotypée, connue sous le nom de stade de Braak. Aujourd'hui ces stades sont considérés comme les étapes d'une propagation de la neurodégénérescence de « type prion » et orientent vers une nouvelle cible potentielle, la protéine tau dans le liquide interstitiel (extraTau). Dans d'autres tauopathies, comme la paralysie supranucléaire progressive, ce type de propagation semble moins évident et cibler la protéine tau à l'intérieur des cellules (intraTau) semble primordial.

Des traitements ciblant la protéine tau, en particulier des immunothérapies, ont été développés et l'injection périphérique d'anticorps monoclonaux anti-tau est déjà en cours d'essais cliniques. Malheureusement, ceux-ci pénètrent mal dans le cerveau, ont des difficultés à parvenir à leur cible dans le liquide interstitiel autour des cellules et n'atteignent pas les protéines intraneuronales. Dans ce contexte, l'ingénierie des anticorps représente une approche alternative pour cibler la protéine tau. Les VHHs sont des fragments d'anticorps de camélidés présentant de nombreux avantages, ils peuvent notamment être exprimés au sein des cellules ou être sécrétés dans le compartiment extracellulaire.

Notre groupe a développé le VHH Z70 ciblant une séquence de la protéine tau connue pour son rôle majeur dans la formation des agrégats, l'hexapeptide $_{306}\text{VQIVYK}_{311}$ nommé PHF6. Ce projet de thèse, réalisé à la fois dans des modèles murins aigus mais également chroniques, nous a permis d'évaluer la capacité de ce VHH à réduire la pathologie tau en agissant directement dans les cellules (intraZ70) ou en ciblant la protéine tau dans le liquide interstitiel (extraTau). Cette étude pose également la question des effets indésirables d'une expression à long terme des VHHs anti-tau. En effet, le PHF6 n'est pas un épitope spécifique de la protéine tau pathologique et est présent sur la protéine tau endogène. Nous avons ainsi contrôlé que les VHHs Z70 n'affectent pas le fonctionnement du cerveau.

Ce travail de thèse a permis de démontrer l'efficacité des VHHs Z70 dans la prévention des déficits cognitifs ou de l'atrophie cérébrale et dans la réduction de l'hyperphosphorylation neuronale de la protéine tau. L'innocuité de l'approche a été confirmée par de multiples indicateurs. Cette étude valide ainsi la faisabilité de réduire directement la pathologie tau dans les cellules ou d'en limiter sa propagation. La comparaison des approches de ciblage intraTau et extraTau a également permis une meilleure compréhension mécanistique de leurs activités et présente un intérêt général pour le développement de biothérapies anti-tau.

Mots clés : Protéine tau, tauopathies, immunothérapie, VHH

ABSTRACT

Tauopathies are a group of heterogeneous neurodegenerative diseases characterized by intracellular accumulation of aggregates of tau protein. In Alzheimer's disease, tau pathology progresses in a stereotypical manner, known as Braak stages. Today, these stages are considered to be the steps of a “prion-like” spread of neurodegeneration and point to a new potential target, tau protein in the interstitial fluid (extraTau). In other tauopathies, such as progressive supranuclear palsy, this type of spread seems less obvious, and targeting tau protein inside cells (intraTau) appears to be essential.

Therapeuticss targeting tau protein, particularly immunotherapies, have been developed, and peripheral injection of anti-tau monoclonal antibodies is already in clinical trials. Unfortunately, these antibodies do not penetrate the brain well, have difficulty attaining their target in the interstitial fluid around cells, and do not reach intraneuronal proteins. In this context, antibody engineering represents an alternative approach to targeting tau protein. VHHs are camelid antibody fragments with many advantages, including the ability to be expressed within cells or secreted into the extracellular compartment.

Our group developed VHH Z70 targeting a sequence of the tau protein known for its major role in aggregate formation, the hexapeptide ₃₀₆VQIVYK₃₁₁ named PHF6. This thesis project, performed in both acute and chronic mouse models, allowed us to evaluate the ability of this VHH to reduce tau pathology by acting directly in cells (intraZ70) or by targeting tau protein in the interstitial fluid (extraTau). This study also raises the question of the adverse effects of long-term expression of anti-tau VHHs. Indeed, PHF6 is not a specific epitope of pathological tau protein and is present on endogenous tau protein. We therefore checked that Z70 VHHs do not affect brain functions.

This thesis demonstrated the efficacy of Z70 VHHs in preventing cognitive deficits and brain atrophy and in reducing neuronal hyperphosphorylation of tau protein. The safety of the approach was confirmed by multiple indicators. This study therefore validates the feasibility of directly reducing tau pathology in cells or limiting its spread. The comparison of intraTau and extraTau targeting approaches also provided a better mechanistic understanding of their activities and is of general interest for the development of anti-tau biotherapies.

Keywords : tau protein, tauopathies, immunotherapy, VHH

FORMATIONS ET COMMUNICATIONS

Formations :

- *Gérer efficacement sa documentation avec Zotero* (EDBSL, mars 2023)
- Summer School "*Preclinical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy: from the bench to the bedside*" (Université Miguel Hernandez, Alicante, juillet 2023)
- *Transmission des connaissances scientifiques mais pas que!* (Université de Lille, septembre 2023)
- *Anglais conversationnel* (Université de Lille, mars à juin 2024)
- *Intégrité Scientifique : Noir? Gris? Blanc? : où est votre curseur?* (Lille Neurosciences et Cognition, juin 2024)
- *48e colloque AFSTAL* (juin 2024, Alpha Visa Congrès / Lille)

Posters:

- *Echange doctorants/M1* (Faculté de Médecine, Lille, mars 2023): "Targeting of pathological tau protein in the interstitial fluid using anti-PHF6 minibody"
- *Lil N'Doc day* (LilNCog, Lille, mars 2023): "Targeting of pathological tau protein in the interstitial fluid using anti-PHF6 minibody"
- *Eurotau* (comité Eurotau, Lille, avril 2023): "Targeting of pathological tau protein in the interstitial fluid using anti-PHF6 minibody"
- *Single domain Antibodies 2023* (Institut Pasteur, Paris, septembre 2023): "VHH targeting of pathological tau protein"
- *Euron PhD Days 2024* (Lille, février 2024): "VHH targeting of pathological tau protein"
- *Tau Global Conference* (Londres, avril 2024): "Anti-Tau VHH Therapy Against PHF6: A Safe Approach to Slowing the Phenotype of Tau Pathology"
- *Single domain Antibodies 2025* (Utrecht, septembre 2025): "Anti-Tau VHH Therapy Against PHF6: A Safe Approach to Slowing the Phenotype of Tau Pathology"

Présentations orales :

- *Lil N'Doc day* (LilNCog, mars 2023) : "Targeting of pathological tau protein in the interstitial fluid using anti-PHF6 minibody"
- *Lil N'Doc day* (LilNCog, Lille, mai 2024) : "VHH targeting of tau protein"
- *TAME* (Lille, juillet 2024): "Assay of anti-tau VHHs in a mouse model of tauopathy"

- *Lil N'Doc day* (LiINCog, Lille, juillet 2025) “Safety and efficiency of intra or extracellular targeting of tau with VHH in mouse models”
- *TAME* (Lille, juillet 2025): “Safety and efficiency of anti-tau intra or extraZ70 in mouse models”

Grand public :

- *Fête de la science 2023* (Musée d'Histoire Naturelle de Lille, octobre 2023): Construction et présentation d'un atelier “Musclez votre cerveau” pour les scolaires (2 jours) et le grand public (2 jours).
- *Declics* (Lycée Faidherbe Lille, décembre 2023) : Echange entre lycéen et professionnels de la recherche.
- *Semaine du Cerveau 2024* (LiINCog, Lille, mars 2024) : Organisation de portes ouvertes du bâtiment Biserte et présentation d'un atelier sur les tests comportementaux des rongeurs.
- *Portes ouvertes 2025* (LiINCog, Lille, mars 2025) : Création d'un poster grand public sur les thérapies dirigées contre la protéine tau.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	I
RESUME	III
ABSTRACT	IV
FORMATIONS ET COMMUNICATIONS	V
SOMMAIRE	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES ABBREVIATIONS	XIV
INTRODUCTION	1
1. Physiologie de la protéine tau	2
1.1. Le gène <i>MAPT</i> et la protéine tau	2
1.2. Fonctions de la protéine tau	4
2. Les Tauopathies	6
2.1. La protéine tau pathologique	6
2.2. Classification des tauopathies	8
2.2.1. Hétérogénéité clinique	9
2.2.2. Hétérogénéité lésionnelle et cellulaire	10
2.2.3. Hétérogénéité régionale et d'évolution spatio-temporelle	11
2.2.4. Hétérogénéité biochimique	13
2.2.5. Hétérogénéité des agrégats	13
3. L'hypothèse prion like	15
3.1. Nucléation de la protéine tau	15
3.2. Propagation de la protéine tau pathologique	17
4. Les stratégies thérapeutiques	18
4.1. Modification de l'expression de tau	19

4.2.	Ciblage des modifications post-traductionnelles	19
4.3.	Ciblage de l'agrégation	21
4.4.	Immunothérapies	22
4.4.1.	Les anticorps conventionnels	22
5.	Les fragments d'anticorps	25
5.1.	Les fragments d'anticorps conventionnels.....	25
5.2.	Les VHHs	27
5.2.1.	Découverte	27
5.2.2.	Structure et propriétés des VHHs.....	28
5.2.3.	Sélection et production des VHHs	30
5.2.4.	Utilisation en clinique.....	31
5.2.5.	Développement des VHHs dans la recherche contre les tauopathies	31
OBJECTIFS DE THESE		35
MATERIELS ET METHODES		38
1.	Construction des VHHs.....	39
2.	Culture cellulaire	39
2.1.	Transfection des cellules	39
2.2.	Modèle de nucléation <i>in vitro</i>	39
3.	Vecteurs viraux.....	40
3.1.	Sélection des sérotypes d'AAV	40
3.2.	Modélisation chronique	40
3.3.	Modèle de seeding	41
4.	Animaux.....	41
4.1.	Lignée transgénique	41
4.2.	Modèle chronique	42
4.3.	Modèle de nucléation <i>in vivo</i>	43
5.	Injectons stéréotaxiques	44
6.	Tests comportementaux	45

6.1. Test des membres inférieurs	45
6.2. Champ ouvert	45
6.3. Labyrinthe en Y	45
7. Imagerie cérébrale	46
7.1. Imagerie par résonance magnétique (IRM)	46
Acquisitions :	46
Traitement des données :	47
7.2. Tomographie à Emission de Positons (TEP).....	48
8. Sacrifice et prélèvement des tissus	48
9. Extraction d'ADN et qPCR.....	49
10. Histologie	49
10.1. Immunohistochimie	49
10.2. Immunohistofluorescence.....	50
11. Tests Biochimiques	51
11.1. Lysats hippocampiques	51
11.2. Séparation des fractions soluble et insoluble	53
12. Analyse du plasma	53
13. Analyses statistiques	54
RESULTATS.....	55
A. Développement des outils de modélisation.....	56
1. Adressage intra et extracellulaire des VHHs	56
2. Sélection du vecteur viral pour une modélisation chez la souris.....	58
3. Expression des VHHs après injection intra-hippocampique chez la souris	60
B. Etude de l'innocuité du Z70 ciblant la protéine tau intra ou extracellulaire	65
1. Prise de poids des animaux	65
2. Imagerie cérébrale	66
3. Etudes comportementales	69
4. Marqueurs plasmatiques.....	71

5. Marqueurs cérébraux.....	72
6. Conclusion sur l'innocuité	74
C. Efficacité des VHHs Z70 à réduire la pathologie tau par un ciblage intra ou extracellulaire	75
1. Amélioration du phénotype comportemental dans un modèle chronique de tauopathie ..	75
2. Prévention de l'atrophie cérébrale	77
3. Effet des intra et extraZ70 sur la pathologie tau.....	78
4. Modulation de la chronicité du modèle Tg30	83
5. Ciblage des espèces extracellulaires de protéine tau par l'extraZ70.....	84
6. Conclusion sur l'efficacité.....	85
D. Le Z70 peut-il se passer de protéine rapportrice ?	86
DISCUSSION & PERSPECTIVES	89
1. Les outils de modélisation	90
1.1. Passage de la BHE par les AAV	91
1.2. Passage de la BHE par les VHHs.....	92
2. Activité des VHHs Z70.....	93
2.1. Innocuité des intra et extraZ70	93
2.2. Les modèles de tauopathies.....	94
2.3. Efficacité thérapeutique du Z70	95
3. Perspectives :.....	97
3.1. Stratégies de dégradation de la cible :	97
3.2. Amélioration de la stabilité du Z70 :	99
CONCLUSION.....	100
BIBLIOGRAPHIE	101
ANNEXES.....	145

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Isoformes de la protéine tau dans le SNC	3
Figure 2: Domaines de la protéine tau	3
Figure 3: Localisations et fonctions physiologiques de la protéine tau	5
Figure 4: La protéine tau en conditions pathologiques.....	7
Figure 5: Liste non-exhaustive des tauopathies.....	8
Figure 6: Corrélation entre les symptômes cliniques et les maladies neurodégénératives	10
Figure 7: Caractérisation immunohistochimique de lésions tau.....	10
Figure 8: Evolution spatio-temporelle de la pathologie tau dans différentes tauopathies	12
Figure 9: Classification des tauopathies selon la structure des fibres de protéine tau	14
Figure 10: Protéines prions et mécanisme de nucléation.....	16
Figure 11: Stratégies thérapeutiques ciblant la protéine tau	18
Figure 12: Immunothérapies ciblant la protéine tau en développement clinique	22
Figure 13: IgG et ses fragments.....	26
Figure 14: Les immunoglobulines de type G des camélidés	27
Figure 15: Structure des VHs et des VHHs.....	28
Figure 16: Epitope et effets du VHH Z70.....	34
Figure 17: Composition des vecteurs viraux exprimant la GFP.....	40
Figure 18: Composition des vecteurs viraux exprimant les intra ou les extraVHHs	41
Figure 19: Transgène et phénotype d'expression de tau dans les souris Tg30.....	42
Figure 20: Schéma expérimental de la modélisation chronique.....	43
Figure 21: Schéma expérimental de la modélisation de nucléation in vivo.....	44
Figure 22: Test de la paralysie des membres postérieurs.....	45
Figure 23: Les différentes constructions utilisées et leur localisation cellulaire.....	57
Figure 24: Distribution de l'expression et sélection des AAVs.....	59
Figure 25: Stabilité de l'expression des VHHs par vecteur viral.....	61
Figure 26: Co-localisation de l'intraZ70 avec des marqueurs des différentes voies de dégradation intracellulaire.....	62
Figure 27: Localisation de l'extraZ70 dans les différentes voies de sécrétion.....	63
Figure 28: Prise de poids de souris WT après injection avec l'intra ou l'extraZ70.....	65
Figure 29: Imagerie cérébrale des souris WT	67
Figure 30: Représentation des tenseurs de diffusion	67
Figure 31: Intégrité axonale des souris WT	68

Figure 32: Effet de l'intra et extraZ70 sur les fonctions motrices et cognitives des souris WT	70
Figure 33: Dosage plasmatique de marqueurs périphériques sanguins	72
Figure 34: Effets des intra ou extraZ70 sur les marqueurs cérébraux	73
Figure 35: Effet des intra et extraZ70 sur les fonctions motrices et cognitives des souris Tg30	76
Figure 36: L'intra et l'extraZ70 améliore le volume cérébral des souris Tg30 par IRM	77
Figure 37: Caractérisation du phénotype des tenseurs de diffusion dans les souris Tg30	78
Figure 38: Lésions tau dans les régions avec ou sans expression des VHHs	79
Figure 39: Co-marquage entre les intraVHHs et AT8	80
Figure 40: Effet de l'intraZ70 sur la protéine tau pathologique.....	81
Figure 41: Effet de l'intraZ70 sur d'autres marqueurs cérébraux de la pathologie tau.....	82
Figure 42: Analyse des espèces pro-nucléantes dans les souris des groupes intraVHHs	82
Figure 43: Etude chronique de 6 mois des souris Tg30 exprimant les intra et extraVHHs	83
Figure 44: Lésions tau après expression des extraVHHs dans un modèle de nucléation	85
Figure 45: Expression du VHH Z70 avec et sans protéine rapportrice	86
Figure 46: Effet des intraVHHs avec ou sans protéine rapportrice dans le modèle Tg30 chronique ...	87
Figure 47: Détection du VHH Z70 exprimé chez la souris	88
Figure 48: Biodistribution du transgène après injection intraveineuse d'AAV2/9	92
Figure 49: Stratégies de dégradation de protéines par des molécules chimères.....	98
Figure 50: Localisation des hexapeptides PHF6* et PHF6 sur la protéine tau 2N4R	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Comparaison des propriétés physico-chimiques des anticorps et des différents types de fragments d'anticorps	29
Tableau 2: Liste des VHHs ciblant la protéine tau <i>Cter</i>	33
Tableau 3: Répartition des animaux pour la modélisation chronique	43
Tableau 4: Anticorps utilisés pour les marquages immunohistochimiques et leurs conditions expérimentales.....	50
Tableau 5: Anticorps utilisés pour les marquages immunohistofluorescents et leurs conditions expérimentales.....	51
Tableau 6: Anticorps utilisés pour les tests biochimiques et leurs conditions expérimentales.....	52

.

LISTE DES ABREVIATIONS

A β :	Peptide amyloïde
AAV :	Adenovirus Associated Virus
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	ADN complémentaire
AGLA :	Astrogliopathie liée à l'âge
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate
AP :	Antéro-Postérieur
APP :	Protéine précurseur de l'amyloïde
ARN :	Acide Ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
AUTAC:	Chimère ciblant l'autophagie
aTTP :	Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura
BHE:	Barrière Hémato-Encéphalique
CA1 :	Première aire de la corne d'Ammon
CAR-T :	Lymphocytes T à Récepteur Antigénique Chimérique
CDR:	Complementary Determining Response
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
CH :	Chaîne lourde constante
CMV :	Cytomégalovirus
CNPase :	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
CPP :	Cell Penetrating Peptide
Cryo-EM :	Cryomicroscopie électronique
CT :	Computed Tomography
C-ter :	Carboxy terminale
DCB :	Démence Cortico-Basale
DGA :	Démence à Grains Argyrophiles
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNF :	Dégénérescence Neuro-Fibrillaire
DV :	Dorso-Ventral
DTI :	Diffusion Tensor Imaging
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
ETC :	Encéphalopathie Traumatique Chronique
EPI :	Echo planar
FA :	Fraction d'Anisotropie
Fab :	Fragment de liaison à l'antigène
Fc :	Fragment constant
FDG :	Fluorodeoxyglucose
FOV :	Field of view
FR :	Framework
FRET :	Transfert d'énergie par résonance de fluorescence
FTDP-17 :	Démences Fronto-Temporales avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17
Fv :	Fragment variable
GFAP :	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP:	Green Fluorescent Protein
GSK3 β :	Glycogen synthase kinase 3 β
GSS :	Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker

HCab:	Heavy chain antibody
HSPG :	Héparanes Sulfates Protéoglycanes
Ig :	Immunoglobuline
IGF-1:	Insuline-like Growth Factor-1
Ig-NAR:	Immunoglobuline New Antigen Receptor
IL2ss :	Séquence de sécrétion de l'interleukine 2
IRM:	Imagerie par Résonance Magnétique
kDa :	Kilo Daltons
KI :	Knock-in
KO :	Knock-out
LONG :	Diffusivité longitudinale
LRP-1 :	Low-density lipoprotein receptor-related protein-1
MA :	Maladie d'Alzheimer
MAP :	Microtubule Associated Protein
<i>MAPT</i> :	Microtubule Associated Protein Tau
MBP :	Myelin Based Protein
ML :	Médio-Latéral
MOY :	Diffusivité moyenne
MPT :	Modification Post-Traductionnelle
MTBR :	Domaine de liaison aux microtubules
NfL :	Neurofilament Light chain
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NPC:	Maladie de Niemann-Pick de type C
N-ter :	Animo-terminale
OAS :	Oligonucléotide Antisens
PAF :	Paraformaldéhyde
PBS :	Tampon phosphate salin
PD-L1:	Programmed Death ligand 1
PHF :	Paired Helical Filament
PIP ₂ :	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PROTAC :	Chimère ciblant la protéolyse
PRP ^c :	Protéine Prion cellulaire
PRP ^{sc} :	Protéine Prion scrapie
PSP :	Paralysie Supranucléaire Progressive
qPCR :	Réaction en chaîne par polymérase quantitative
RAD :	Diffusivité radiale
scFv :	Fragment variable à chaîne unique
SNC :	Système Nerveux Central
siRNA :	petit ARN interférent
SUV :	Standardized Uptake Value
TDP-43 :	TAR DNA binding protein-43
TE:	Temps d'Echo
TEP:	Tomographie par Emission de Positrons
TfR :	Récepteur à la transferrine
Tg30 :	Souris transgénique Tg(Thy1- <i>MAPT</i> *)30Schd
TGG :	Tauopathie Gliale Globulaire
TNT :	Tampon Tris, NaCl, Tween
TPLA :	Tauopathie Primaire Liée à l'Age
TR :	Temps de Répétition
TRIM21 :	Protéine 21 contenant un motif tripartite
UCH-L1 :	Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase L
VCP :	Protéine contenant de la vasoline

VH :	Chaîne variable lourde
VHH :	Variable Heavy chain of the Heavy chain only
VL :	Chaîne variable légère
VLP :	Virus Like Particle
WT :	Wild-Type
YFP :	Yellow Fluorescent Protein

INTRODUCTION

1. Physiologie de la protéine tau

La protéine tau a été découverte en 1975 associée aux microtubules dans le cerveau porcin (Weingarten et al., 1975). Elle a ainsi été classée comme protéine associée aux microtubules (MAP 'Microtubule Associated Protein'). Depuis, cette protéine a été fortement étudiée tant au niveau de sa physiologie que de son rôle dans les maladies neurodégénératives.

1.1. Le gène *MAPT* et la protéine tau

La protéine tau est encodée par un unique gène nommé *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau) situé sur le locus 17q21 du chromosome 17 (Neve et al., 1986). Le transcrit du gène *MAPT* est constitué de 16 exons et subit un épissage alternatif (Goedert et al., 1989; Himmler, 1989). Les exons 0 et 14 ne sont pas traduits. Huit exons sont constitutifs (1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13) et sont inclus dans toutes les isoformes. L'inclusion de l'exon 4A engendre une protéine nommée 'big tau' de 110 kilo Daltons (kDa) (Oblinger et al., 1991) retrouvée uniquement dans le système nerveux périphérique (Taleghany & Oblinger, 1992) et dans la rétine (Boyne et al., 1995). Les isoformes de tau contenant l'exon 6 sont très minoritaires et principalement retrouvés dans le système nerveux périphérique (Wei & Andreadis, 1998). L'exon 8 n'est traduit que chez les bovins (W. T. Chen et al., 1994). Le gène *MAPT* n'est pas exprimé uniquement dans les tissus nerveux, la protéine tau est retrouvée également en périphérie dans une grande variété de tissus (Gu et al., 1996; Sigala et al., 2014).

Dans le système nerveux central (SNC) humain, six isoformes sont présents selon l'épissage des exons 2, 3 et 10 (Figure 1). Dans la partie N-terminale de tau, l'épissage de l'exon 2 ou de l'exon 2 couplé avec l'exon 3 va donner les formes 0N, 1N ou 2N. Dans le domaine de liaison aux microtubules, l'épissage de l'exon 10 donnera les formes 3R ou 4R (Goedert et al., 1989). Au stade fœtal, seule l'isoforme 0N3R est présent (Couchie & Nunez, 1985). Dans le cerveau humain adulte, les six isoformes sont représentés (Goedert et al., 1989) ; alors que le ratio des isoformes 3R et 4R est plutôt identique, la quantité des isoformes 0N, 1N ou 2N est distincte avec un préférentiel pour les formes 1N (Trabzuni et al., 2012).

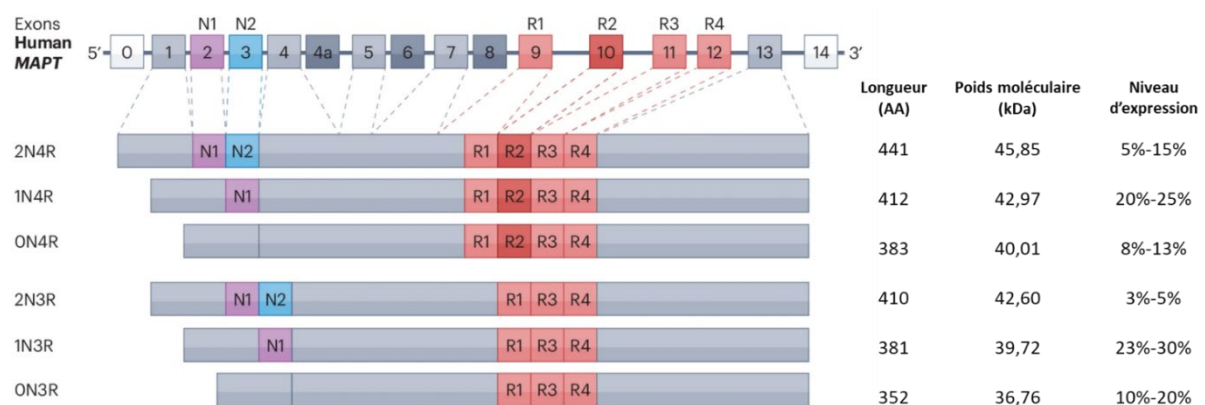


Figure 1: Isoformes de la protéine tau dans le SNC

Dans le SNC humain adulte, 6 isoformes de tau sont retrouvés. Ils varient selon l'inclusion des exons 2 (N1) et 3 (N2) dans la partie N-terminale et de l'exon 10 (R2) dans les domaines de liaison aux microtubules. Adapté de (Buchholz & Zempel, 2024; Parra Bravo et al., 2024)

En plus de l'épissage alternatif de l'ARN, de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) de la protéine tau ont été décrites aboutissant à une grande hétérogénéité de molécules de protéine tau. La phosphorylation, glycosylation, acétylation, méthylation, oxydation, nitration, ubiquitination, et SUMOylation de la protéine tau vont réguler sa fonction et ses interactions avec ses partenaires (Guo et al., 2017; J. Yang et al., 2023).

La protéine tau peut être divisée en quatre domaines aux propriétés caractéristiques : un domaine N-terminal, un domaine riche en proline, un domaine de liaison aux microtubules (MTBR pour 'Microtubule Binding Repeat') et un domaine C-terminal (Figure 2).

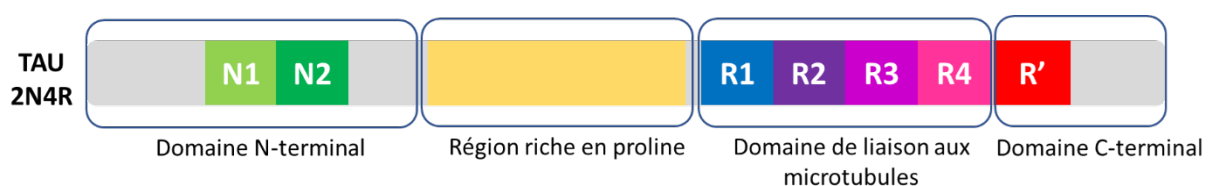


Figure 2: Domaines de la protéine tau

La protéine est divisée en 4 domaines : la partie N-terminale contenant 0, 1 ou 2 exons, un domaine riche en proline, un domaine de liaison aux microtubules contenant 3 ou 4 répétitions et un domaine C-terminal avec une région R'.

La partie N-terminale ou domaine de projection contient des sites de fixation au cytosquelette, aux vésicules intracellulaires et à la membrane plasmique (Brandt et al., 1995) et interagit avec plusieurs protéines de cette dernière. Le domaine riche en proline interagit avec l'actine (He et al., 2009) ainsi

qu'avec des protéines contenant un domaine SH3 (Reynolds et al., 2008). Le domaine de liaison aux microtubules est composé de trois ou quatre séquences répétées et interagit fortement avec les microtubules régulant leur polymérisation et leur stabilisation. Les isoformes 4R ont une affinité plus forte pour la tubuline que les isoformes 3R. Le domaine C-terminal présente une séquence R' identifiée comme une cinquième région de liaison aux microtubules et augmentant fortement l'affinité pour les microtubules (Gustke et al., 1994).

1.2. Fonctions de la protéine tau

Dans le neurone mature, la protéine tau est principalement retrouvée dans le compartiment axonal (Binder et al., 1985). Le segment d'initiation de l'axone forme une barrière de diffusion qui permet la rétention de la protéine tau dans la partie distale de l'axone (X. Li et al., 2011; Zempel et al., 2017). La protéine tau a d'abord été décrite pour son rôle sur les microtubules (Weingarten et al., 1975), elle va réguler leur polymérisation ainsi que leur stabilisation (Figure 3) (Trinczek et al., 1995). Elle est également impliquée dans le transport axonal antérograde et rétrograde et le trafic des organites (Dixit et al., 2008; Seitz et al., 2002), ainsi que dans la formation et l'élongation de l'axone (Knops et al., 1991).

La protéine tau est retrouvée en plus faible quantité au niveau de la membrane plasmique (Brandt et al., 1995; Pooler et al., 2012) et du compartiment somato-dendritique (Tashiro et al., 1997) au niveau duquel son interaction avec Fyn va avoir un rôle dans la myélinisation (Klein et al., 2002; Sotiropoulos et al., 2014). Dans la synapse, la protéine tau a été retrouvée dans les compartiments pré- et post-synaptiques (Figure 3) (Tai et al., 2012). L'interaction entre la protéine tau et Fyn au niveau de la synapse joue également un rôle dans la modulation des récepteurs au glutamate N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) (Hoover et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). L'étude de souris Knock-Out pour le gène *MAPT* (KO-Tau) a permis de mettre en évidence son rôle dans la plasticité synaptique (T. Ahmed et al., 2014; Kimura et al., 2014). Elle est aussi impliquée dans la dynamique de l'actine (Elie et al., 2015; Fulga et al., 2007).

D'autres organites contiennent une faible quantité de la protéine tau : les mitochondries (Jung et al., 1993; Tracy et al., 2022) ; dans lesquelles la protéine tau interagit avec plusieurs protéines mitochondriales mais dont la fonction physiologique est à ce jour inconnue ; et le noyau (Brady et al., 1995; Greenwood & Johnson, 1995; Loomis et al., 1990), dans lequel tau est impliquée dans la protection de l'ADN (Rico et al., 2022; Sultan et al., 2011; Violet et al., 2014), la stabilisation de la

chromatine (Mansuroglu et al., 2016; Rico et al., 2021) et la régulation de la transcription (Benhelli-Mokrani et al., 2018; Chauderlier et al., 2018).

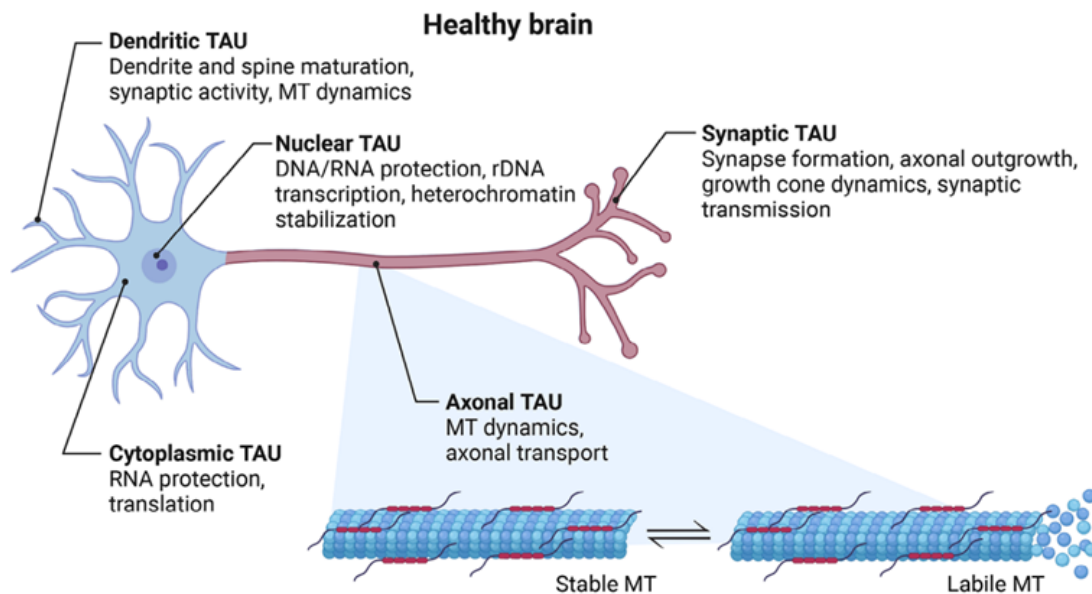


Figure 3: Localisations et fonctions physiologiques de la protéine tau

La protéine tau assure de nombreuses fonctions physiologiques dans différents compartiments cellulaires. Elle est présente au niveau de l'axone, du cytoplasme, du noyau, des dendrites et des synapses. Adapté de (Buchholz & Zempel, 2024).

La protéine tau est également présente dans le compartiment extracellulaire. En effet, elle est sécrétée physiologiquement et cette sécrétion est régulée par l'activité neuronale (Karch et al., 2012; Katsinelos et al., 2018; Pooler et al., 2013; Sayas et al., 2019; Yamada et al., 2011, 2014). Une étude a mesuré à 0,3% la quantité de protéine tau libérée par les neurones dans le milieu extracellulaire (Chai et al., 2012). La protéine tau ne contenant pas de peptide signal, sa libération dans le milieu extracellulaire est médiée par un mécanisme non-conventionnel comme les vésicules extracellulaires (Dujardin et al., 2014; Simón et al., 2012). Néanmoins, la majeure partie de la protéine tau est sécrétée sous forme libre (Kanmert et al., 2015; Y. Wang et al., 2017) par sa translocation à travers la membrane plasmique. Les composants de cette voie de sécrétion non-conventionnelle sont le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) qui permet la liaison de la protéine tau à la membrane plasmique ainsi que les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) qui facilitent son export à travers la membrane (Katsinelos et al., 2018; Merezhko et al., 2018). Différentes études montrent également l'implication de protéines chaperonnes (Fontaine et al., 2016) et de petites protéines G comme Rab7A (Mohamed et al., 2017; Rodriguez et al., 2017) ainsi qu'une participation de la voie de sécrétion régulée par l'autophagie (Kang et al., 2019).

2. Les Tauopathies

Les tauopathies sont un ensemble de maladies neurodégénératives hétérogènes ayant pour caractéristique commune la présence d'agrégats de la protéine tau au niveau cérébral. La tauopathie la plus répandue est la maladie d'Alzheimer (MA), qui touche environ 1 million de personnes en France. Alois Alzheimer est le premier en 1906 à décrire les symptômes cliniques de sa patiente atteinte de démence et à observer la présence de lésions intra-neuronales faites d'enchevêtrements fibrillaires dans le cortex (Alzheimer et al., 1995). Beaucoup plus tard, la microscopie électronique a permis de visualiser ces fibres composées de filaments appariés en hélices parallèles nommés PHF pour 'Paired Helical Filaments' (Kidd, 1963; Terry, 1963). Par la suite, le composant principal de ces lésions sera identifié, il s'agit de la protéine tau (Brion et al., 1985; Grundke-Iqbal et al., 1986; Wood et al., 1986).

2.1. La protéine tau pathologique

En conditions pathologiques, les MPT de la protéine tau sont fortement modifiées, parmi lesquelles l'augmentation de la phosphorylation, qui est la référence dans les tauopathies. Plusieurs sites de phosphorylations physiologiques sont retrouvés hyperphosphorylés en conditions pathologiques et de nouveaux sites de phosphorylation apparaissent (Zheng-Fischhöfer et al., 1998). Dans la MA, cette hyperphosphorylation est observée dès le début de la pathologie et avant l'agrégation de la protéine tau (Buee et al., 2000; Köpke et al., 1993; Ksiezak-Reding et al., 1992) et est décrite comme une étape cruciale dans la formation des filaments de protéines tau (Braak et al., 1994). Une fois hyperphosphorylée, la protéine tau va se détacher des microtubules, s'accumuler dans les corps cellulaires des neurones et former des pré-enchevêtrements. Bien que la structure des monomères de protéine tau soit désordonnée, un changement de conformation semble être impliqué dans l'initiation de formation d'oligomères qui vont former à leur tour des filaments : les PHFs. L'agrégation intraneuronale de protéine tau entraîne la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). La séquestration de la protéine tau dans les PHFs entraîne une détérioration des fonctions physiologiques de celle-ci : perte de dynamique du cytosquelette, du transport axonal, dysfonctionnement des synapses, des mitochondries (DuBoff et al., 2012; Manczak & Reddy, 2012) et des lysosomes (Kim et al., 2023) (Figure 4). La protéine tau pathologique gagne également des fonctions toxiques parmi lesquelles : la dérégulation de l'endocytose (Ando et al., 2021) et de l'autophagie (Dhapola et al., 2025), l'apparition

de gliose et de neuroinflammation (Abadin et al., 2024; Jin et al., 2021) ainsi qu'une altération des fonctions nucléaires (Antón-Fernández et al., 2023).

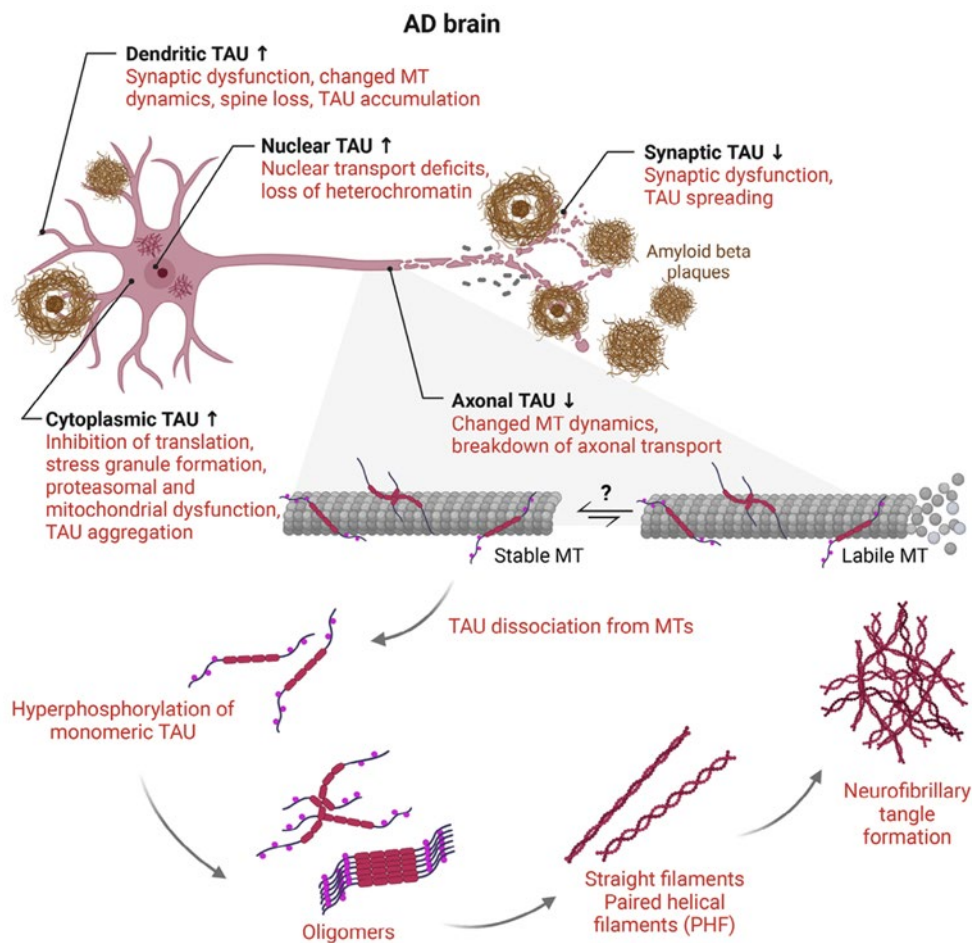


Figure 4: La protéine tau en conditions pathologiques

Dans les tauopathies, la localisation de la protéine tau est modifiée, une perte des fonctions physiologiques et un gain de fonctions toxiques sont observés. La protéine subit une hyperphosphorylation et une agrégation conduisant à la formation d'oligomères, puis de PHFs et enfin, d'enchevêtrements neurofibrillaires. Adapté de (Buchholz & Zempel, 2024).

Outre la phosphorylation, d'autres MPT de la protéine tau sont impliquées dans la pathologie. L'acétylation de la protéine tau augmente significativement dans le cerveau de patients atteints de tauopathies (Shin et al., 2021; Tracy et al., 2016). Les modifications de l'acétylation modifient la localisation de la protéine (Sohn et al., 2016) ainsi que sa dégradation et entraînent une augmentation de son agrégation (Caballero et al., 2021; Min et al., 2010). Des variations de la méthylation, glycosylation, ubiquitinylation et SUMOylation sont également observées en conditions pathologiques (Thomas et al., 2012; J. Yang et al., 2023). La troncation de la protéine tau par des protéases, comme les caspases, conduit à une altération importante de sa structure et de ses fonctions. Sa protéolyse amène à une multitude de fragments tronqués de la partie N-terminale ou de la partie C-terminale ou

des deux. Selon le site de troncation, une perte de fonction ou un gain de fonction toxique peut apparaître (Rizzi & Grinberg, 2024). Dans le liquide interstitiel issu de cerveau de modèles murins de tauopathies, la protéine tau est retrouvée sous forme tronquée et sa quantité diminue avec l'avancée de la pathologie (Barini et al., 2022). Certains fragments sont uniquement retrouvés dans le liquide cébrospinal (LCS) de patients atteint de MA ouvrant une piste diagnostique (Amadoro et al., 2014; Barthélemy, Gabelle, et al., 2016).

2.2. Classification des tauopathies

L'ensemble des pathologies neurodégénératives présentant des agrégats de protéine tau sont rassemblées sous le terme de tauopathies (Spillantini, Goedert, et al., 1997). Les tauopathies primaires, ne contenant que des lésions de la protéine tau, se distinguent des tauopathies secondaires, incluant d'autres lésions anatomopathologiques concomitantes aux agrégats de tau (Figure 5).

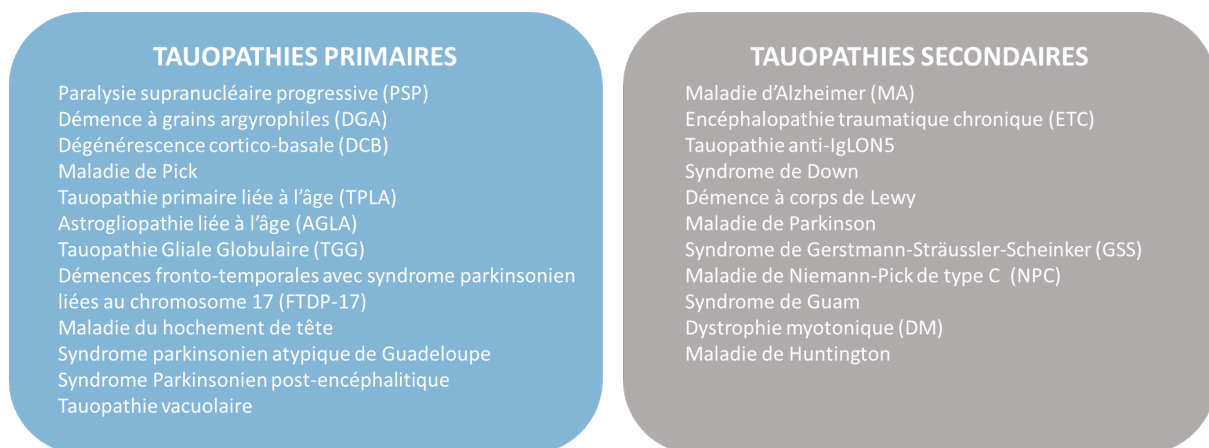


Figure 5: Liste non-exhaustive des tauopathies

On distingue les tauopathies primaires, avec lésions tau uniquement, des tauopathies secondaires, présentant plusieurs lésions anatomopathologiques, par exemple : dépôts de peptides Aβ dans la MA et la ETC, agrégats d'α-synucléine dans la démence à corps de Lewy et la maladie de Parkinson, dépôts de protéine prion dans le GSS, accumulation tissulaire (lysosomale) de cholestérol non estérifié et de divers sphingolipides dans la NPC., agrégats de huntingtine dans la maladie de Huntington.

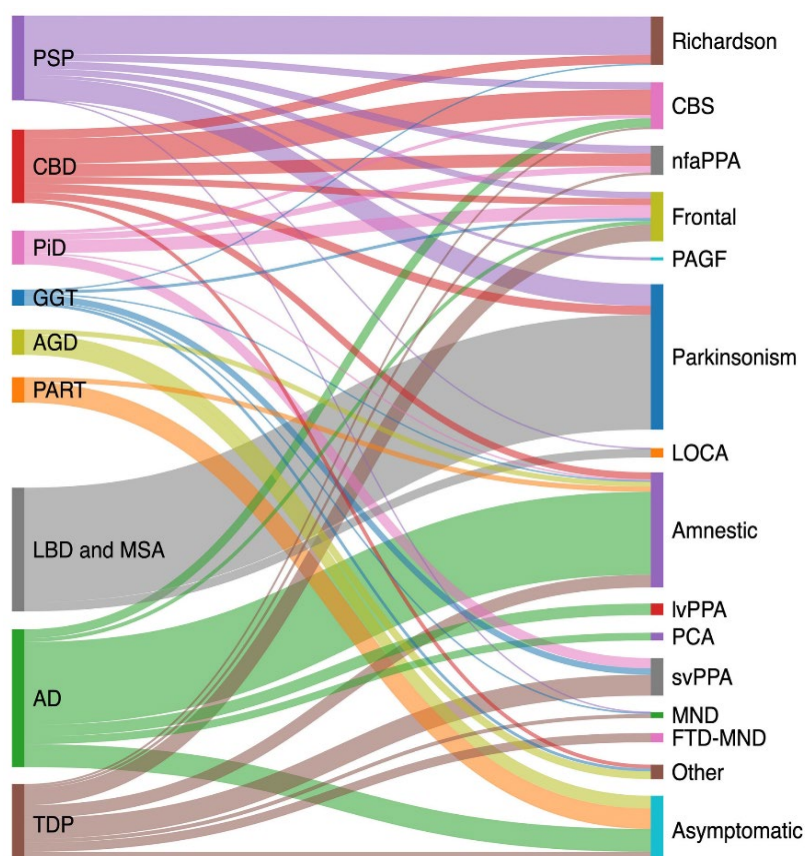
L'étiologie de ces pathologies est le plus souvent sporadique mais certaines tauopathies peuvent avoir des origines génétiques. Des mutations dans le gène *MAPT* sont associées aux démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (FTDP-17) (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998) ou aux cas de maladies de Pick familiale (Tavakoli et al., 2015). D'autres tauopathies ont une étiologie génétique sans mutation de *MAPT* ; par exemple des mutations dans les gènes de

l'APP (protéine précurseuse de l'amyloïde) ou des présénilines entraînent des formes familiales de MA (Price & Sisodia, 1998), une mutation du gène de VCP (protéine contenant de la vasoline) entraînent une tauopathie vacuolaire. D'autres tauopathies peuvent être causées par des facteurs environnementaux, comme le syndrome parkinsonien atypique de Guadeloupe (Lannuzel et al., 2008). Enfin, l'encéphalopathie traumatique chronique est imputée à des traumatismes crâniens à répétition, chez certains sportifs par exemple (Katsumoto et al., 2019). Néanmoins, la plupart des tauopathies ont une origine non identifiée.

Quelle qu'en soit la cause, les tauopathies sont une famille de maladies neurodégénératives complexes et hétérogènes à plusieurs niveaux.

2.2.1. Hétérogénéité clinique

Depuis plusieurs décennies, il est établi que le degré de démence est corrélé avec la quantité de DNF (Duyckaerts et al., 1997; Nelson et al., 2007; Tomlinson et al., 1970). Les symptômes cliniques des patients indiquent quelles régions du système nerveux sont affectées (Arriagada et al., 1992; Franzmeier et al., 2022). Cependant, cette concordance n'est pas parfaite et la plupart des diagnostics de tauopathies ne peuvent être effectués que par autopsie. De plus, la diversité et l'hétérogénéité des symptômes ainsi que leur évolution au cours du temps complexifient un diagnostic précis (Figure 6).



(Figure de la page précédente)

Figure 6: Corrélation entre les symptômes cliniques et les maladies neurodégénératives

Les pathologies diagnostiquées sont représentées à **gauche** : PSP : paralysie supranucléaire progressive ; CBD : démence cortico-basale ; PiD : maladie de Pick ; GGT : tauopathie gliale globulaire ; AGD : démence à grains argyrophiles ; tauopathies liée à l'âge ; LBD : maladie à corps de Lewy ; MSA : atrophie multisystématisée ; AD : maladie d'Alzheimer ; TDP : maladie de la protéine de liaison à l'ADN à réponse transactive. **A droite** sont représentés les syndromes cliniques : CBS : syndrome corticobasal ; nfaPPA : aphasie primaire progressive non fluente ; PAGF : akinésie progressive et gel de la marche ; LOCA : ataxie cérébelleuse d'apparition tardive ; lvPPA : aphasie primaire progressive logopénique ; PCA : atrophie corticale postérieure ; svPPA : aphasie primaire progressive sémantique ; MND : maladie du neurone moteur ; FTD-MND : démence fronto-temporale avec maladie du neurone moteur. L'épaisseur du trait représente le degré de contribution d'un phénotype clinique dans la pathologie. (Olfati et al., 2022) .

2.2.2. Hétérogénéité lésionnelle et cellulaire

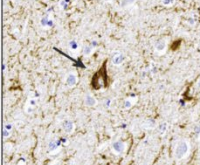
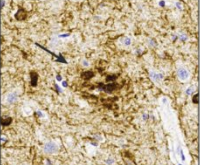
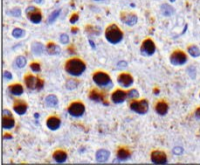
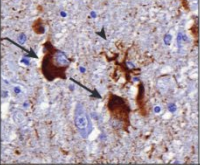
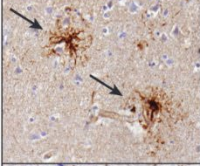
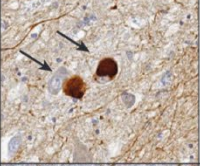
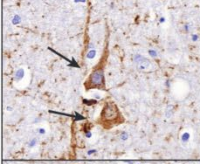
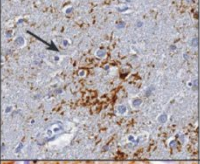
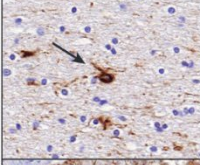
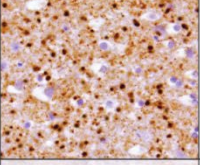
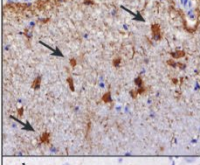
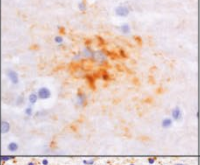
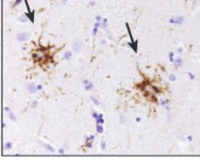
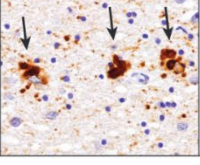
Une autre manière de différencier les tauopathies est le type cellulaire affecté et la distribution des fibres de protéine tau pathologique. Selon la localisation des agrégats, des tauopathies à lésions neuronales (maladie de Pick), à lésions mixtes neuronales et gliales (MA, PSP, DCB, DGA, ETC) ou à lésions gliales uniquement (TGG, AGLA) peuvent être distinguées.

Les lésions de protéine tau neuronale peuvent être des enchevêtrements ou pré-enchevêtrements, des plaques neuritiques ou des inclusions / grains cytoplasmiques comme dans la DGA et la maladie de Pick. Dans plusieurs tauopathies, les agrégats de protéine tau sont retrouvés les cellules gliales. Des touffes astrocytaires sont observées dans la PSP ainsi que des plaques astrocytaires dans la DCB (Komori, 1999; Nishimura et al., 1992). Les oligodendrocytes quant à eux peuvent présenter des corps bobinés ou des inclusions globulaires qui sont retrouvés dans une majorité de tauopathies comme la PSP, la DCB, la DGA, la TGG, la maladie de Pick et la FTDP-17. Ces lésions sont néanmoins absentes dans la MA (Figure 7) (Kahlson & Colodner, 2016; Majumder & Dutta, 2024).

(Figure de la page suivante)

Figure 7: Caractérisation immunohistochimique de lésions tau

Des coupes de cerveaux de patients atteints de différentes tauopathies ont été analysées par un marquage immunohistochimique avec un anticorps dirigés contre la protéine tau ainsi qu'une contre-coloration au crésyl violet afin de caractériser les différentes lésions. En orange : les caractéristiques des lésions, en bleu : leur localisation et en vert la tauopathie du patient (Creekmore et al., 2024)

Inclusions	Descriptions	Inclusions	Descriptions
	Neurofibrillary tangle (NFT) (flame-shaped structure, arrow) 3R/4R phosphorylated tau filaments Neuronal cytoplasm of frontal neocortex Alzheimer's disease (AD) case		Neuritic plaque (arrow) 3R/4R tau-positive dystrophic neurites along with abundant neuropil threads Frontal neocortex AD case
	Pick bodies (spherical structures) 3R tau-positive Hippocampal neuronal cytoplasm Pick's disease (PiD) case		Ballooned neurons (arrows) 3R tau Cytoplasm (diffuse) PiD case Ramified astrocyte (arrowhead) 3R tau Cell body and processes in hippocampus PiD case
	Tufted astrocytes (arrows) 4R tau Proximal parts of frontal neocortex processes Progressive supranuclear palsy (PSP) case		Globose-shaped NFTs (arrows) 4R tau Neuronal cytoplasm in midbrain PSP case
	Pretangles (arrows) Diffuse neuronal cytoplasmic tau immunoreactivities Frontal neocortex Globular glial tauopathy (GGT) case		Astrocytic plaque (arrow) Distal parts of astrocytic processes containing 4R tau Frontal neocortex Corticobasal degeneration case
	Coiled body (curved oligodendroglial cytoplasmic inclusion, arrow) 4R tau Subcortical white matter of frontal neocortex PSP case		Diffuse argyrophilic grains (arrows) Punctate structures in the neuropil, detected with silver staining or 4R tau immunostaining Temporal neocortex Argyrophilic grain disease case
	Thorn-shaped astrocytes (arrows) Tau-positive astrocytic structure Cytoplasm and proximal processes of subpial temporal neocortex Chronic traumatic encephalopathy case		Granular/fuzzy astrocytes (arrows) Fine granular tau-positive structures Astrocytic processes in the frontal neocortex Aging-related tau astroglialopathy case
	Globular astrocytic inclusions (arrows) Dot-like and globular structures Astrocytic cytoplasm and processes in the putamen GGT case		Globular oligodendrocytic inclusions (arrows) Globular structures Oligodendroglial cell in subcortical white matter of frontal neocortex GGT case

2.2.3. Hétérogénéité régionale et d'évolution spatio-temporelle

Dans la MA, la pathologie tau apparaît initialement dans des régions cérébrales très circonscrites, soit la formation hippocampique, et progresse ensuite dans tout le cerveau selon un schéma stéréotypé caractéristique. Cette progression hiérarchique entre les régions a posé les bases d'un système de 'stades' de la MA décrit par Braak et Braak (Braak & Braak, 1991). Ce système donne la topographie de l'évolution spatio-temporelle de la DNF dans la MA en 6 stades. La pathologie tau progresse des régions transentorhinales à l'hippocampe (stades I et II), puis au néocortex temporal, frontal et pariétal (stades III et IV) pour finir dans les aires unimodales et sensorimotrices du néocortex (stades V et VI) (Figure 8a). Cependant, depuis cette description se limitant au cortex cérébral, d'autres zones subcorticales

encore plus précoces ont été découvertes, comme le locus coeruleus et le noyau basal de Meynert (Braak & Del Tredici, 2011; Mesulam et al., 2004).

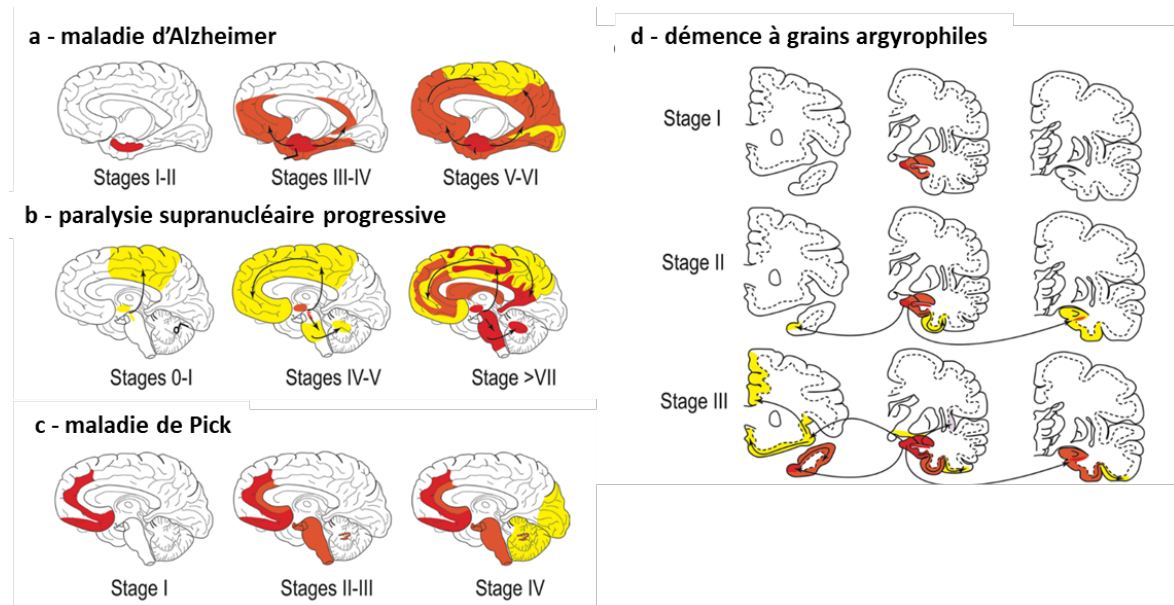


Figure 8: Evolution spatio-temporelle de la pathologie tau dans différentes tauopathies

(a) Les stades de Braak décrivent la distribution et l'évolution de la MA. **(b)** Description de l'évolution de la PSP. **(c)** Description de l'évolution de la maladie de Pick. **(d)** Description de l'évolution de la DGA. Adapté de (Colin et al., 2020)

Dans la PSP, la distribution des lésions de tau ne suit pas la même topographie. Aux stades 0 et I, on retrouve la pathologie dans le complexe pallido-luysio-nigral et du cortex prémoteur. Les noyaux du pont, dentelé et gris centraux présentent une pathologie modérée aux stades II et III. Cette atteinte devient sévère aux stades IV et V et intègre les lobes frontaux et pariétaux. Les stades VI et VII représentent l'augmentation de la sévérité dans toutes ces zones. Aux stades supérieurs à VII, une atteinte des zones néocorticales et du cervelet apparaît (Figure 8b) (Brendel et al., 2018; Cope et al., 2018; Verny et al., 1996; Williams et al., 2007). Dans la DGA, une autre évolution spatio-temporelle est observée. Elle débute dans le gyrus parahippocampique, l'hippocampe et l'amygdale (stade I). Puis atteint le subiculum, les cortex entorhinal et transentorhinal (stade II), pour finalement toucher le gyrus angulaire, le noyau accumbens, l'insula et l'hypothalamus (stade III) (Figure 8c) (Y. Saito et al., 2004). La maladie de Pick présente encore une autre distribution de la pathologie, le stade I concerne les régions limbiques les régions néocorticales frontotemporales et le gyrus angulaire. Au stade II, les noyaux et la substance blanche du tronc cérébral sont touchés. La pathologie progresse au cortex moteur au stade III et au cortex visuel et au cervelet au stade IV (Figure 8d) (Irwin et al., 2016).

2.2.4. Hétérogénéité biochimique

Une classification des tauopathies a été établie sur la base des isoformes de protéine tau contenus dans les agrégats. Des tauopathies dans lesquelles les lésions sont majoritairement constituées d'inclusions de protéine tau avec trois domaines de liaisons aux microtubules (0N3R, 1N3R, 2N3R) comme la maladie de Pick et certaines FTDP-17 peuvent être distinguées des tauopathies dans lesquelles les lésions sont majoritairement constituées d'inclusions avec quatre domaines de liaison aux microtubules (0N4R, 1N4R, 2N4R) comme la PSP, la DGA, la DCB et d'autres formes de FTDP-17. Dans d'autres tauopathies, parmi lesquelles la MA, les six isoformes de la protéine tau sont retrouvés dans les lésions et un mélange de protéine tau avec trois ou quatre domaines de liaison aux microtubules constitue les fibres. Cependant ce ratio n'est pas équimolaire, contrairement au ration 3R/4R retrouvé dans un cerveau sain (Buchholz & Zempel, 2024; Buée & Delacourte, 1999; Delacourte et al., 1999; Sergeant et al., 2008).

Les isoformes 4R ayant une meilleure capacité de stabilisation des microtubules que les formes 3R, le ratio 3R/4R est important pour un fonctionnement normal de la protéine tau. Dans certains cas de forme familiale de tauopathies, une altération de l'épissage de l'exon 10 modifie ce ratio en faveur des isoformes 4R qui peut être une cause de la pathologie (Boyarko & Hook, 2021; Miyamoto et al., 2001). Les isoformes peuvent également influencer le type d'agrégats : alors que les isoformes 3R de tau s'assemblent en PHFs torsadés, les isoformes 4R s'assemblent en filaments droits (Goedert et al., 1996).

2.2.5. Hétérogénéité des agrégats

Depuis plusieurs décennies le noyau des PHFs a été identifié comme le domaine de liaison aux microtubules (Goedert et al., 1988; Wille et al., 1992; Wischik et al., 1988). Plus précisément deux hexapeptides présents dans cette région ont été identifiés comme importants dans l'agrégation de la protéine tau : le PHF6₃₀₆VQIVYK₃₁₁ situé au début du troisième domaine de répétition, donc présent sur tous les isoformes et le PHF6*₂₇₅VQIINK₂₈₀ localisé au début du deuxième domaine de répétition et présent uniquement dans les isoformes 4R (Ganguly et al., 2015; Macdonald et al., 2019; von Bergen et al., 2000, 2001).

Les avancées en cryomicroscopie électronique (cryo-EM) ont permis de caractériser plus en détail la structure des fibres de protéine tau et ont mis en évidence une hétérogénéité, chaque tauopathie ayant une structure spécifique (Shi et al., 2021). Les domaines de liaison aux microtubules semblent être différenciellement impliqués dans la formation des fibres (Figure 9). Dans la MA et la TPLA, le

noyau des fibres est composé des résidus V306 à F378, c'est-à-dire les domaines R3 et R4 ainsi que la partie C-terminale (Falcon, Zhang, Schweighauser, et al., 2018). Dans l'ETC, bien que les mêmes régions soient impliquées, une structure différente est observée avec la formation d'une cavité hydrophobique (Falcon et al., 2019). Dans la maladie de Pick, l'implication du R1 est mise en évidence (Falcon, Zhang, Murzin, et al., 2018). Dans les tauopathies constituées uniquement de fibres 4R, des structures à trois ou quatre couches peuvent être distinguées. Elles sont composées des résidus des trois derniers domaines de liaison aux microtubules et de la partie C-terminale de la protéine tau (W. Zhang et al., 2020). Néanmoins, l'hexapeptide PHF6 est présent dans toutes les structures observées.

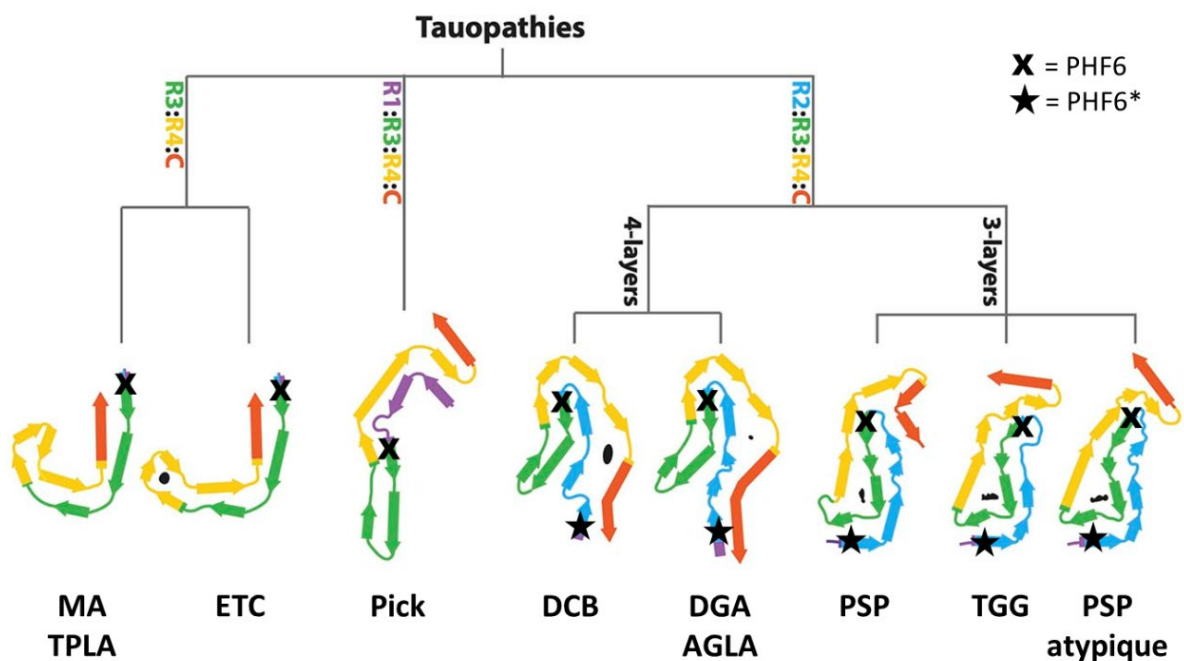


Figure 9: Classification des tauopathies selon la structure des fibres de protéine tau

Représentation des structures de fibres de protéine tau observées par cryo-EM et caractéristiques des différentes tauopathies. Les domaines de liaison aux microtubules sont représentés en violet pour le R1, en bleu pour le R2, en vert pour le R3, en jaune pour le R4. Le domaine C-terminal est en rouge. La croix représente la position de l'hexapeptide PHF6 et l'étoile celle du PHF6. Adapté de (Shi et al., 2021)*

3. L'hypothèse prion like

Les capacités d'agrégation de la protéine tau, sa présence dans les fluides biologiques ainsi que la propagation stéréotypée par des régions anatomiquement connectées ont orienté vers un questionnement d'un comportement de la protéine tau semblable à la protéine prion aussi nommé 'hypothèse prion-like'. Ce phénomène est décrit par deux phases : la nucléation et la propagation.

3.1. Nucléation de la protéine tau

Les tauopathies mais également d'autres maladies neurodégénératives sont caractérisées par la présence et l'accumulation de protéines mal conformées. Les lésions observées dans la MA présentent des plaques extracellulaires composées de peptides amyloïdes (A β) agrégés concomitamment aux agrégats de protéines tau. Certaines démences fronto-temporales présentent des accumulations de la protéine TAR DNA binding protein-43 (TDP-43) (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). Des agrégats d'alpha-synucléine sont le composant principal des corps de Lewy retrouvés dans la maladie de Parkinson, la démence à corps de Lewy et l'atrophie multi-systématisée (Spillantini, Schmidt, et al., 1997). La maladie de Huntington est caractérisée par une accumulation intraneuronale de protéine huntingtine anormale (Trottier et al., 1995). Le changement de structure de ces protéines vers une conformation pathologique est une étape cruciale dans toutes ces maladies neurodégénératives.

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles sont un autre groupe de maladies neurodégénératives présentant cette caractéristique. Chez l'humain, cette famille de pathologies inclue la maladie de Creutzfeldt-Jakob, le Kuru, le GSS et l'insomnie fatale familiale (Prusiner et al., 1998). Dans ces pathologies, la protéine prion soluble cellulaire (PrP^c) va adopter une conformation pathologique dite tremblante ou 'scrapie' (PrP^{sc}) (Prusiner, 1982). Cette forme est transmissible, la PrP^{sc} va se comporter comme un agent de nucléation en recrutant la PrP^c endogène. Ainsi les oligomères formés vont s'élonger pour former des protofibrilles, puis des agrégats sous forme de fibres (Figure 10). Cette transmissibilité est également associée à la notion de souche ; une diversité des conformations des fibres est observée entre les individus et lors de la conversion la conformation est conservée (Igel et al., 2023).

/

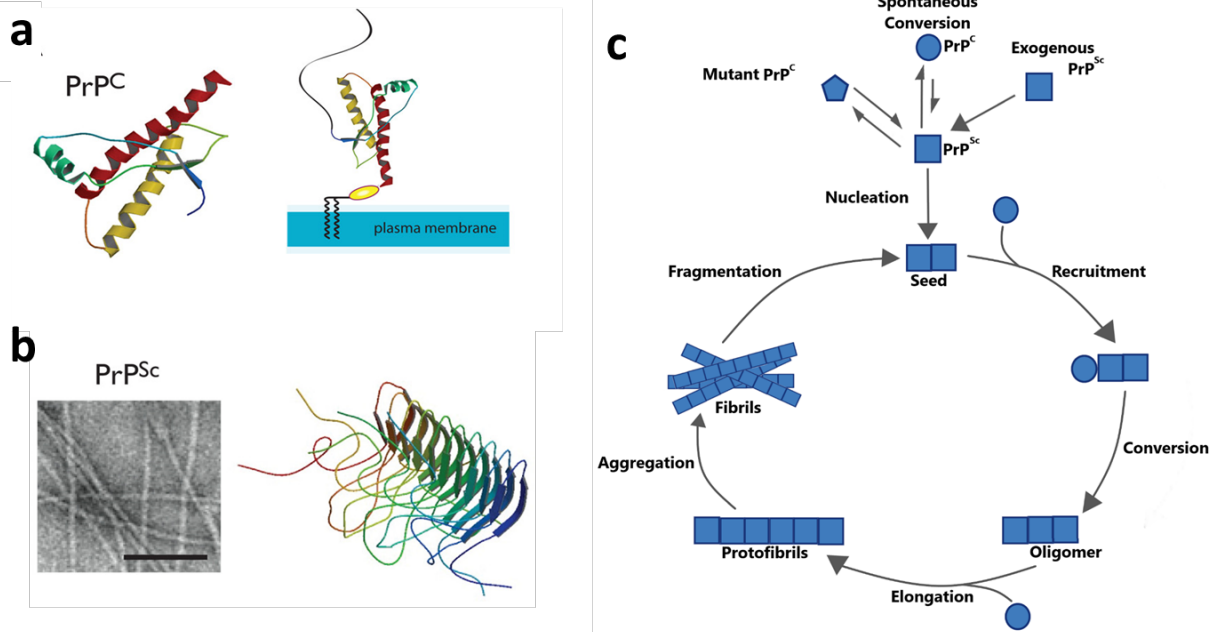


Figure 10: Protéines prions et mécanisme de nucléation

(a) Structure de la PrP^C déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN). La protéine PrP^C endogène est localisée à la membrane plasmique. **(b)** La forme PrP^{Sc} forme des agrégats en forme de fibres (barre d'échelle = 1000 Å). **(c)** Schéma du modèle de conversion et de nucléation. La formation de PrP^{Sc} peut être initiée par une mutation dans le gène PRNP qui code la PrP^C, une conversion spontanée de PrP^C endogène ou une infection par une PrP^{Sc} exogène. La PrP^{Sc} initiale subit une nucléation qui peut recruter et convertir des PrP^C supplémentaires et entraîne la formation de protofibrilles puis d'agrégats fibrillaires. Adapté de (Ghaemmaghami et al., 2014; Marrero-Winkens et al., 2020)

De la même manière, la protéine tau pathologique est un agent de nucléation pouvant induire un changement de conformation. Les oligomères de protéine tau sont capables de convertir la protéine tau soluble pour former de nouvelles fibres (B. B. Holmes et al., 2014; Mirbaha et al., 2015, 2018). Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* suggèrent un polymorphisme de configuration selon l'origine des PHFs. On retrouve également la notion de souche avec la protéine tau. Dans des modèles murins, l'injection intra-cérébrale de fibres de différentes tauopathies engendre des phénotypes d'agrégation différents relatifs à l'origine des fibres injectées (Clavaguera et al., 2013; Dujardin et al., 2018; Narasimhan et al., 2017; Sanders et al., 2014).

3.2. Propagation de la protéine tau pathologique

La deuxième caractéristique de l'hypothèse prion-like est la propagation. De la même manière que pour le prion, les protéines pro-nucléantes peuvent être libérées et, après recapture dans la cellule receveuse, recruter la protéine endogène pour lui transmettre sa mauvaise conformation. Dans la MA, les dernières études en imagerie par résonance magnétique (IRM) ou en tomographie par émission de positrons (TEP) ont permis de valider la propagation de la protéine tau entre des régions cérébrales connectées anatomiquement (connectivité structurelle) ou ayant une forte interaction (connectivité fonctionnelle) (Franzmeier et al., 2022; Schoonhoven et al., 2023), complétant ainsi la description des stades de Braak. Également, les avancées dans la sensibilité de détection des biomarqueurs mis en évidence une hausse de la présence de la protéine tau dans le LCS de patients atteints de MA mais aussi sous forme phosphorylée dans le plasma (Meredith Jr. et al., 2013; Teunissen et al., 2025; Toledo et al., 2013), suggérant une augmentation de la quantité de protéine tau extracellulaire. A ce jour seules trois études ont analysé la protéine tau dans le fluide cérébral de patients atteints de MA. Ces travaux ont mis en évidence la présence de protéine tau sous forme libre ou sous forme vésiculaire capable de nucléation (Leroux et al., 2022; Ruan et al., 2021) et contenant entre autre le domaine PHF6 (Fowler et al., 2025). Dans les autres tauopathies, la quantité de protéine tau dans les fluides extracellulaires ne varie pas par rapport aux sujets sains (Barthélemy, Gabelle, et al., 2016) suggérant que le mécanisme de propagation n'est pas nécessairement commun à toutes les tauopathies présentant une évolution spatio-temporelle (Figure 8).

Le transfert de la protéine tau soluble, oligomérique ou agrégée par les neurones peut s'effectuer par des vésicules extracellulaires (Baker et al., 2016; Polanco et al., 2016) ou via des nanotubes (Abounit et al., 2016; Tardivel et al., 2016). La protéine tau est également transférée sous forme libre. Ce mécanisme n'est pas encore complètement élucidé mais impliquerait l'endocytose et la micropinocytose via notamment le récepteur LRP-1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1) (Rauch et al., 2020) et les HSPGs (B. B. Holmes et al., 2013; Marvian et al., 2024; Rauch et al., 2018; Stopschinski et al., 2018).

4. Les stratégies thérapeutiques

L'Organisation Mondiale pour le Santé estime à 55 millions le nombre de personnes atteintes de MA ou de maladies apparentées dans le monde. Aucune thérapeutique actuelle ne permet de soigner ces pathologies. Les premiers essais dans le traitement des lésions de la MA avaient pour cible le peptide A β . Mais le succès limité de ces thérapies anti-A β a recentré les recherches sur la protéine tau. Cette dernière est une cible communes aux tauopathies et a une meilleure corrélation avec les symptômes cliniques et l'évaluation de la pathologie (Duyckaerts et al., 1997; Franzmeier et al., 2022; Nelson et al., 2007). Les thérapies peuvent cibler l'expression, les modifications post-traductionnelles, l'agrégation ou la clairance de la protéine tau (Figure 11). Plusieurs stratégies ont été testées en recherche clinique.

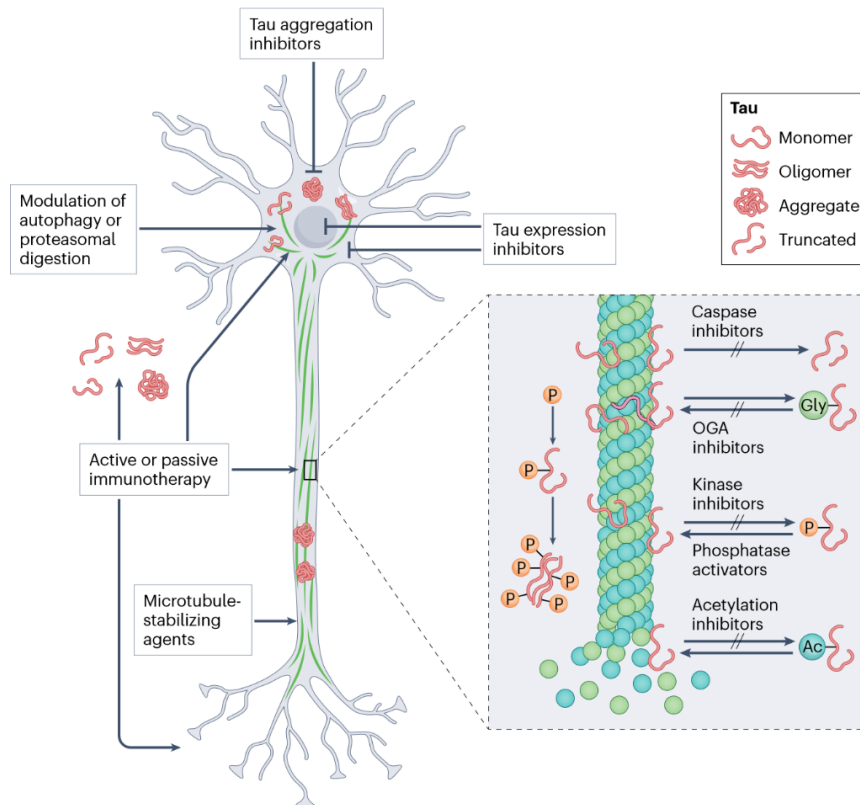


Figure 11: Stratégies thérapeutiques ciblant la protéine tau

Différentes approches thérapeutiques contre la protéine tau en développement pré-clinique ou clinique pour le traitement des tauopathies. Les thérapies peuvent réduire l'expression de la protéine tau. La protéine tau pathologique présente de nombreuses MPT (hyperphosphorylation, acétylation, glycosylation et troncation) dont l'inhibition est une des stratégies thérapeutiques. Certaines molécules vont viser à inhiber son agrégation. La clairance de la protéine tau pathologique peut également être augmentée grâce à des modulateurs d'autophagie ou du protéasome. Les stabilisateurs de microtubule peuvent compenser la perte de fonction dans la dynamique microtubulaire. L'immunothérapie active ou passive peut cibler la protéine tau et promouvoir sa dégradation et sa clairance. Ac, groupement acétyl; Gly, groupement glycosyl; OGA, O-GlcNAcase; P, phosphate (Congdon et al., 2023)

4.1. Modification de l'expression de tau

Parmi les développements de thérapie contre les tauopathies, les oligonucléotides antisens (OAS) semble prometteurs. Les OAS sont des séquences d'ADN simple brin d'une vingtaine de nucléotides qui peuvent se lier spécifiquement à une séquence d'ARN complémentaire et entraînent sa dégradation ou empêchent sa traduction en protéine. Ce processus, basé sur le principe de la régulation physiologique des ARN messagers (ARNm) permet de réduire l'expression d'un gène cible (Schoch & Miller, 2017). Dans le contexte des tauopathies, les OAS anti-tau ciblent l'ARNm issu du gène *MAPT* humain pour réduire l'expression de tau et ont été validés dans les modèles pré-cliniques (DeVos et al., 2017; Sud et al., 2014; Vemula et al., 2023). L'OAS anti-tau BIIB080 développé par IONIS cible l'intron 9 du pré-ARNm du gène *MAPT* et a été testé dans une étude clinique de phase Ib par administration intrathécale (NCT03186989) chez des patients atteints d'une MA. Une réduction de 30 à 50% de la quantité de la protéine tau totale et phosphorylée a été observée dans le LCS avec des événements indésirables légers à modérés (Mummery et al., 2023). Les patients ayant reçu la plus forte dose présentaient aussi une réduction de la protéine tau cérébrale détectée par TEP-scan (Edwards et al., 2023). BIIB080 est actuellement en étude de phase II chez des patients atteints de MA (NCT05399888). Novartis a également développé un OAS anti-tau, le NIO752, qui est actuellement en phase I chez des patients atteints de PSP (NCT04539041) ou de MA (NCT05469360).

En parallèle, la compagnie Lilly teste le LY3954068, un petit ARN interférent (siRNA pour small interferent RNA) ciblant l'ARNm de la protéine tau. Les siRNA sont des molécules d'ARN double brin d'environ 20 à 25 nucléotides. Ils se lient à la séquence complémentaire de l'ARNm, bloquent sa traduction ou induisent sa dégradation. L'administration par voie intrathécale du LY3954068 est actuellement en étude de phase I chez des patients atteints de MA (NCT06297590). Une seule étude pré-clinique est publiée sur cette stratégie et ne montrent pas de signes de neurotoxicité ou de neuroinflammation chez la souris (Xu et al., 2014).

4.2. Ciblage des modifications post-traductionnelles

Au cours de la pathologie, les MPT de la protéine tau sont modifiées avec par exemple : une augmentation de la phosphorylation, de l'acétylation, de la troncation et des modifications de la glycosylation. Différents axes de recherche visant à réduire ces MPT en modulant les enzymes impliquées dans ces processus ont atteint le stade des essais cliniques.

- Activation des phosphatases

Le sélénate de sodium active la phosphatase PP2A et réduit la phosphorylation et l'agrégation de tau dans des modèles animaux (T. Ahmed et al., 2014; Corcoran et al., 2010; van Eersel et al., 2010) mais seul un faible bénéfice en IRM de diffusion a été observé dans les essais cliniques sur des patients atteints de MA (Malpas et al., 2016) ou de FTDP (Vivash et al., 2022). Le composé étant bien toléré par voie orale, il est actuellement en essai clinique de phase II pour des patients atteints de FTDP (ACTRN12620000236998) ou de PSP (ACTRN12620001254987).

- Inhibition des kinases

Le chlorure de lithium, déjà prescrit pour traiter les troubles bipolaires est également décrit comme inhibiteur de la glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), une enzyme phosphorylant la protéine tau (Z.-Q. Fu et al., 2010). Malheureusement, les récents résultats de la phase II sur les patients atteints de FTDP ont relevé plusieurs effets indésirables sérieux (NCT02862210). Le tideglusib est une autre molécule inhibant la GSK3 β . En essai de phase II, elle s'est montrée inoffensive mais sans bénéfice clinique (Lovestone et al., 2015).

- Inhibiteurs de déglycosylation

La O-GlcNAcylation, soit l'intégration d'un O-linked β -N-acetylglucosamine sur les résidus sérine et thréonine, a un effet protecteur contre la formation de PHF (Hastings et al., 2017; F. Liu et al., 2004; Permanne et al., 2022). Une stratégie thérapeutique consiste à inhiber l'enzyme O-GlcNase pour réduire la déglycosylation de la protéine tau. Après des résultats pré-cliniques encourageants (X. Wang et al., 2020), plusieurs molécules sont en cours de tests cliniques par voie orale : la LY3372689 (NCT05063539) et ASN51 (NCT06677203) dans la MA.

- Inhibiteurs d'acétylation

L'acétylation anormale de certains résidus de lysine entrave la clairance physiologique de la protéine tau et son homéostasie. Le salsalate, une petite molécule anti-inflammatoire, réduit l'acétylation de la lysine 174, diminue les agrégats de protéine tau et restaure les déficits mnésiques dans les modèles pré-cliniques (Min et al., 2015). Le salsalate n'a pas montré de bénéfice dans une étude clinique dans la PSP (NCT02422485) et est en cours d'étude clinique de phase Ib depuis 2018 dans la MA (NCT03277573).

- Inhibiteurs des caspases

La troncation de la protéine tau en C-terminal apparaît assez tôt dans la MA (Guillozet-Bongaarts et al., 2005) et les fragments générés par la caspase-3 ont tendance à s'agréger et avoir des propriétés toxiques (Cotman et al., 2005; Means et al., 2016; Tapia-Monsalves et al., 2023). Plusieurs molécules comme la cyclophiline D (Olesen et al., 2025) et la minocycline (Noble et al., 2009) ont donné des résultats satisfaisants sur la réduction des espèces tronquées et sur l'évolution de la pathologies dans des modèles. La minocycline a de ce fait été testée en essais cliniques mais n'a pas donné de résultats encourageants sur la MA (Howard et al., 2020).

4.3. Ciblage de l'agrégation

- direct

Certains composés ont montré des propriétés anti-agrégatives sur la protéine tau. Par exemple, des molécules dérivées du bleu de méthylène passent la barrière hémato-encéphalique (BHE), réduisent l'agrégation de la protéine tau et améliorent les fonctions cognitives dans des modèles animaux (Hochgräfe et al., 2015; Hosokawa et al., 2012). Plusieurs essais cliniques de phase III sur des patients atteints de MA ou de DFT ont été réalisés avec un dérivé du bleu de méthylène nommé LMTX par voie orale mais aucun n'a montré de résultats positifs (NCT01689233, NCT01689246, NCT01626378, NCT03446001).

La curcumine réduit également l'agrégation de la protéine tau *in vitro* et diminue le phénotype de tauopathie dans des modèles animaux (Q.-L. Ma et al., 2013 ; Rane et al., 2017). Un essai clinique de phase II (NCT01383161) chez des patients atteints de MA a montré une amélioration de la mémoire spatiale, de la mémoire visuelle et de l'attention ainsi qu'une diminution des ligands se fixant à la protéine tau pathologique en TEP. Une seconde étude de phase II (NCT01811381) est en cours d'analyse.

- indirect

L'agrégation de la protéine tau inhibe la voie d'autophagie par les lysosomes qui est un mécanisme crucial pour la dégradation des protéines à éliminer (Feng et al., 2020). La stimulation de cette voie permettrait d'augmenter l'élimination des agrégats de la protéine tau. Une de ces stratégies est l'inhibition de mTOR, une kinase qui diminue l'activité autophagique, via la rapamycine (Salama et al., 2019). Cette molécule a été testée sur des patients atteints de MA (NCT04629495), les récents résultats ne montrent aucune amélioration cognitive des patients.

Les molécules ciblant les modifications post-traductionnelles, les agrégats ou les voies de l'autophagie ne sont pas spécifiques de la protéine tau et peuvent modifier de nombreuses autres protéines physiologiques. L'utilisation d'anticorps dirigé contre la protéine tau permet de remédier à ce désavantage.

4.4. Immunothérapies

L'immunothérapie anti-tau est testée depuis de nombreuses années, bien avant l'apparition de l'hypothèse d'une progression de la pathologie sur le mode du prion. La mise en évidence de la protéine tau dans le fluide interstitiel a ouvert de nouvelles perspectives et aujourd'hui, la protéine tau extracellulaire, est devenue une cible très intéressante. Plusieurs stratégies sont en cours d'étude, du stade fondamental aux études cliniques.

4.4.1. Les anticorps conventionnels

Au total, quinze anticorps et deux vaccinations ont été testés en essais cliniques comme immunothérapie anti-tau.

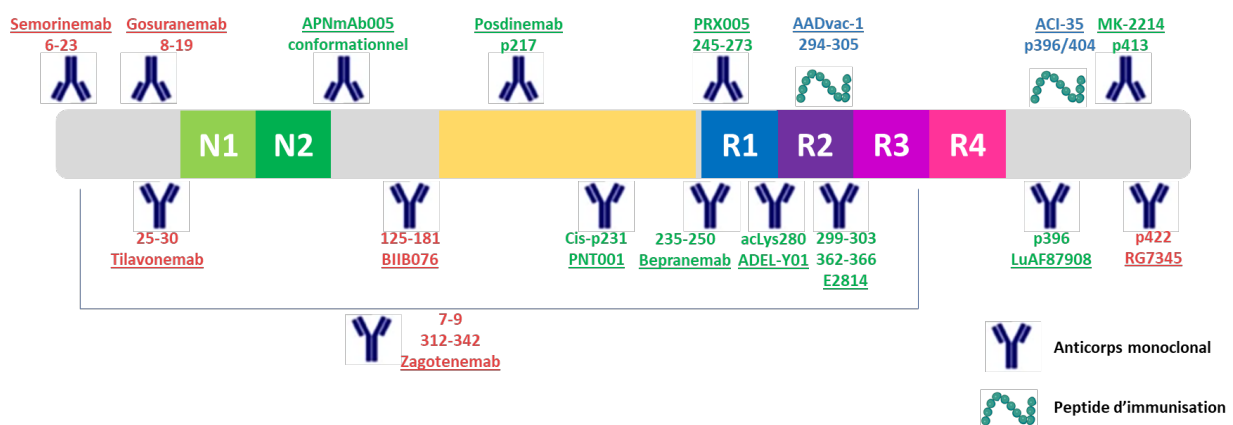


Figure 12: Immunothérapies ciblant la protéine tau en développement clinique

Les immunothérapies contre la protéine tau avec leur(s) épitope(s) correspondant(s). En bleu les immunothérapies actives ; en vert, les immunothérapies passives et en rouge, les anticorps dont les essais sont arrêtés. (p = phosphorylé).

- Immunothérapie active

En 2014, l'AADvac1 est la première immunothérapie anti-tau à être testée en essai clinique (Kontseikova et al., 2014). Le vaccin est composé d'un peptide de la protéine tau contenant les acides aminés 294 à 305. Quatre essais cliniques de phase I ou II par injection sous-cutanée ont été réalisés,

trois sur des patients atteints de MA (NCT01850238, NCT02031198 et NCT02579252), un en cours sur l'aphasie primaire progressive non fluente (nfaPPA), une tauopathie apparentée à la MA et à la DFT (NCT03174886). Les essais sur la MA ont montré une forte immunogénicité et une innocuité avec des effets encourageants sur les biomarqueurs sanguins. Il a été notamment constaté une baisse de marqueurs de mort neuronale NfL (Neurofilament Light chain) (Novak et al., 2021) et de neuroinflammation GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) ainsi qu'une légère diminution de l'atrophie corticale en imagerie cérébrale malgré une absence d'amélioration cognitive (Kovacech et al., 2024).

Le vaccin ACI-35 a également été testé. Il est constitué de 16 copies du peptide de tau phosphorylé sur les sérines 396 et 404, incluses dans des liposomes. Ses essais cliniques ont confirmé son innocuité (ISRCTN13033912) mais la réponse immunitaire étant trop faible, une seconde génération de vaccin est créée avec un changement d'adjuvant et un épitope activant les lymphocytes T auxiliaires. Celui-ci est nommé ACI-35-030. De récents résultats en phase II sur des patients atteints de MA (NCT04445831) ont montré une production d'anticorps anti-tau mais les résultats sur les fonctions cognitives ne sont pas encore connus.

- Immunothérapie passive

La majorité des essais cliniques d'immunothérapie passive est composée d'injection intraveineuse d'anticorps de type immunoglobuline (Ig) IgG1 ou IgG4. Les IgG1 ayant une grande affinité pour les différents sous types de récepteurs au fragment constant (Fc), cet isotype facilite la phagocytose par la microglie. L'affinité des IgG4 pour les récepteurs Fc étant moindre, ils sont utilisés pour éviter les effets indésirables possible suite à une activation microgiale et du complément (Vidarsson et al., 2014; Yu et al., 2020).

Certains anticorps sont actuellement testés en essais cliniques de phase I : le ADEL-Y01 (NCT06247345) une IgG1 ciblant l'acétylation de la lysine 280 (Song et al., 2023) ; le APNmAb005 (NCT05344989) dont le sous type n'est pas dévoilé et décrit comme spécifique des oligomères de protéine tau (Fukumoto et al., 2024) ; le PRX005 une IgG1 reconnaissant le domaine de liaison aux microtubules (Martenyi et al., 2023) ; le PNT001 (NCT04096287) une IgG4 ciblant une conformation cis au niveau de la thréonine 231 phosphorylée (Kondo et al., 2015; Qiu et al., 2021) ; le LuAF87908 (NCT04149860) une IgG1 ciblant les résidus sérines 396 et 404 phosphorylées (Rosenqvist et al., 2018) ainsi que le MK-2214 de chez Merck dont le type d'anticorps n'est pas communiqué mais qui reconnaît la thréonine 413 phosphorylée (NCT05466422).

D'autres ayant validé leur innocuité en phase I, sont actuellement testés en phase II chez des patients atteints de MA. C'est le cas du Posdinemab (ou JNJ 63733657) de chez Janssen (NCT04619420), une IgG1 dirigée contre la thréonine 217 phosphorylée (Bijttebier et al., 2021), du Bepranemab de la

compagnie UCB (NCT04867616), une IgG4 reconnaissant les acides aminés 235 à 250 de la protéine tau (Albert et al., 2019; Courade et al., 2018) et du E2814 du laboratoire Eisai une IgG1 ciblant deux épitopes dans le domaine de liaison aux microtubules (Roberts et al., 2020) associé ou non avec le Lecanemab, un anticorps anti-A β (NCT06602258).

Cependant plusieurs immunothérapies passives anti-tau ont été arrêtées dans leur développement. La phase I du RG7345 ciblant la sérine 422 phosphorylée, dont le sous type n'est pas dévoilé, a été suspendue sans aucune communication (NCT02281786). Le BIIB076, une IgG1 dont l'épitope n'est pas communiqué, a été arrêté suite à la phase I pour des raisons économiques (NCT03056729). D'autres ont atteints la phase II sur des patients atteints de MA ou de PSP mais n'ont pas été plus loin par manque d'efficacité : le Zagotenemab, une version humanisée de type IgG4 de l'anticorps MC1, reconnaît une conformation retrouvée dans les formes précoces des agrégats de protéine tau (Fleisher et al., 2024); le Gosuranemab (Dam et al., 2021; Fleisher et al., 2024) et le Tilavonemab (Florian et al., 2023; Höglinger et al., 2021) sont des IgG4 et ciblent tous les deux la partie amino-terminale, respectivement les acides aminés 15 à 22 et 25 à 30. Le Semorinemab, un anticorps dirigé contre les acides aminés 6 à 23, également dans la partie N-terminale, a montré des améliorations sur la mémoire des mots et une baisse de la quantité de tau dans le LCS mais aucun effet sur les autres tests cognitifs et sur l'imagerie cérébrale (NCT03289143). A ce jour, aucune phase III n'est planifiée.

Les échecs de ces essais cliniques soulèvent plusieurs questions. Dans un premier temps, peu d'anticorps parviennent à passer la BHE, à travers laquelle le transport des macromolécules est restreint, limitant la quantité d'anticorps à atteindre les tissus cérébraux. Seulement 0,1 à 0,2% d'anticorps traverse la BHE (Katsinelos et al., 2019; Poduslo et al., 1994). De plus, la clairance des IgGs dans le LCS est rapide : chez le rat et le primate, la demi-vie des IgGs est inférieure à 1 heure (h) après une injection intrathécale alors qu'elle est en moyenne de 3 semaines en périphérie (Bergman et al., 1998; Noguchi et al., 2017). Leur grande taille limite également leur diffusion au sein du parenchyme cérébral (Wolak & Thorne, 2013). Un autre aspect concerne le choix crucial de l'épitope cible. Plusieurs des immunothérapies stoppées utilisaient des IgGs ciblant la partie amino-terminale de la protéine tau. Cependant l'analyse du LCS de patients atteints de MA révèle peu de forme N-terminale (Barthélemy, Fenaille, et al., 2016; Barthélemy, Gabelle, et al., 2016). De plus, le mécanisme d'action des anticorps anti-tau n'est pas clairement défini. Des observations de clairance du complexe tau-anticorps via les récepteurs Fc de la microglie ont été décrites (Luo et al., 2015; Yanamandra et al., 2015). Néanmoins, une étude démontre la même efficacité contre la pathologie tau in vivo entre un anticorps anti-tau et sa version mutée pour empêcher l'interaction avec les récepteurs Fc (Lee et al., 2016). Une autre hypothèse est le blocage de l'internalisation de la protéine tau par les neurones (Yanamandra et al., 2013). Cependant, plusieurs groupes ont démontré une internalisation d'anticorps

dirigés contre la protéine tau par les neurones (Asuni et al., 2007; Collin et al., 2014; Congdon et al., 2019; Kondo et al., 2015). Ces derniers ne présentant pas ou très peu de récepteurs Fc à la membrane (Y. Zhang et al., 2014), le mécanisme d'internalisation des anticorps ou du complexe antigène-anticorps n'est pas établi. Mais la présence de ce complexe à l'intérieur de la cellule est reconnue par un récepteur Fc cytosolique, la protéine 21 contenant un motif tripartite (TRIM21). TRIM21 est également une ubiquitine-ligase qui va entraîner la prise en charge du complexe par le protéasome et provoquer sa dégradation (Fletcher et al., 2015; Hauler et al., 2012). Son implication dans l'efficacité des immunothérapies avec des anticorps anti-tau a été démontrée dans plusieurs modèles (Gaikwad et al., 2024; McEwan et al., 2017; Mukadam et al., 2023).

L'immunothérapie cible en grande partie la protéine tau extracellulaire malgré la présence de la majorité des protéines pathologiques à l'intérieur des cellules. Dans ce contexte, une optimisation de l'immunothérapie est nécessaire.

5. Les fragments d'anticorps

Pour répondre aux limitations des anticorps, plusieurs formats alternatifs ont montré leur potentiel pour une application thérapeutique ou diagnostique. Conservant la région variable des immunoglobulines, ces petites protéines gardent une spécificité et une affinité comparables aux anticorps. Les fragments d'anticorps dit 'conventionnels' et les fragments d'anticorps issus d'anticorps spécifiques aux camélidés sont deux catégories en cours de développement.

5.1. Les fragments d'anticorps conventionnels

Les anticorps conventionnels ou immunoglobulines sont des protéines tétramériques en forme de 'Y'. Ils sont formés de deux hétérodimères connectés par des ponts disulfures, chacun comprenant une chaîne lourde et une chaîne légère. Le fragment variable (Fv), localisé au sommet des chaînes lourdes et légères, est responsable de la reconnaissance de la cible. Différents formats de combinaisons de VH et de VL sont en cours de développement. Ils permettent de diminuer l'immunogénicité et d'augmenter la diffusion (Figure 13).

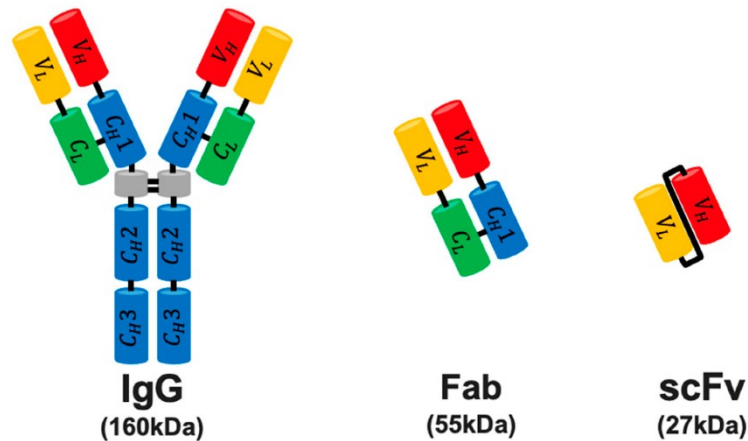


Figure 13: IgG et ses fragments

Les IgG sont composées de deux chaînes lourdes composées de domaines constants identiques (CH en bleu) suivies d'un domaine lourd variable (VH en rouge) et de deux chaînes légères composées de domaines constant (CL en vert) et variable (VL en jaune). Le Fab est composé d'un domaine constant et d'un domaine variable pour la chaîne lourde et pour la chaîne légère. Le scFv inclue uniquement les domaines variables. Adapté de (Z. Liu et al., 2024)

Le fragment de liaison à l'antigène (Fab) est composé d'un domaine constant et d'un domaine variable pour la chaîne lourde ainsi que pour la chaîne légère. D'un poids moléculaire d'environ 55 kDa, il présente un site de liaison à l'antigène. L'absence de fragment Fc empêche sa liaison au récepteur Fc entraînant une réponse inflammatoire via la microglie. Il peut être obtenu par clivage de l'anticorps parent ou par synthèse de protéine recombinante (Crivianu-Gaita & Thompson, 2016).

D'une taille de 25 à 30 kDa, le fragment variable à chaîne unique (scFv pour 'single-chain variable fragment') est un peptide recombinant composé des domaines variables lourd (VH) et léger (VL) reliés et stabilisés par un peptide de liaison. C'est le plus petit fragment d'anticorps conventionnel comprenant le domaine de liaison à l'antigène.

Plusieurs scFvs ciblant la protéine tau ont été développés afin de réaliser de l'imagerie cérébrale en TEP (Banka et al., 2023) ou à visée thérapeutique (Ising et al., 2017; Spencer et al., 2018; Y. Zhang, Qian, et al., 2022). Le plus avancé en étude pré-clinique est le scFv dérivé de l'anticorps MC1 ciblant une conformation pathologique de la protéine tau. Son expression par vectorisation virale permet de diminuer la pathologie dans un modèle murin de tauopathie par une injection dans le parenchyme cérébral (Vitale et al., 2018) ou par injection intramusculaire (Vitale et al., 2020). Dans ce dernier cas, le scFv-MC1 est exprimé dans le muscle par un vecteur viral de type AAV (Adenovirus Associated Virus) permettant de traverser la BHE.

5.2. Les VHHs

5.2.1. Découverte

En 1989, lors d'une purification de plasma de chameau par chromatographie sur protéine A et protéine G en travaux pratiques, l'équipe de Raymond Hamers découvre un nouveau type d'immunoglobulines. En effet, ces animaux ont à la fois des immunoglobulines classiques de type IgG1 présentant un domaine variable avec une chaîne légère (VL) et une chaîne lourde (VH) et des immunoglobulines de type IgG2 et IgG3 avec un domaine variable uniquement composé d'une chaîne lourde nommé VHH pour 'Variable Heavy Chain of the Heavy chain only antibody' (Figure 14) (Hamers-Casterman et al., 1993). Ces anticorps particuliers seront appelés HCAs pour 'Heavy-Chain Antibodies'. Par la suite, les HCAs seront retrouvés dans toutes les espèces des camélidés : chameau, dromadaire, lama, vigogne et alpa (Conrath et al., 2003). Dans les autres taxons, les HCAs n'ont été identifiés que dans certaines espèces de requins où ils sont appelés Ig-NAR (Immunoglobuline New Antigen Receptor) (Greenberg et al., 1996). Ces derniers ont une origine phylogénétique éloignée et une structure différente des HCAs des camélidés, suggérant une convergence évolutive entre ces deux particularités immunologiques (Flajnik et al., 2011).

Les HCAs sont donc dépourvus de la chaîne légère mais également du domaine constant CH1 (Muyldermans et al., 1994). L'absence du CH1 est attribuée à une mutation dans l'extrémité 5' de son gène qui perturbe un site d'épissage consensus (Khong Nguyen et al., 1999).



Figure 14: Les immunoglobulines de type G des camélidés

Les camélidés possèdent des IgG1 formées d'un fragment constant (Fc) comprenant les domaines constants lourds (CH2 et CH3), et les domaines constants légers (CL) et d'un fragment variable comprenant les domaines variables légers (VL) et lourds (VH). Les IgG2 et IgG3 sont dépourvues de chaînes légères et de CH1. Leur domaine variable est le VHH ou Nanobody® (Nb). Adapté de (Muyldermans, 2013)

5.2.2. Structure et propriétés des VHHs

Les VHHs, également nommés nanocorps, ont une structure proche des VHs en termes de séquence et de structure. Ils sont tous les deux composés de quatre régions constantes appelées Framework (FR) et de trois régions variables nommées 'Complementarity Determining Region' (CDR). Cependant des différences entre les deux structures sont notables (Figure 15).

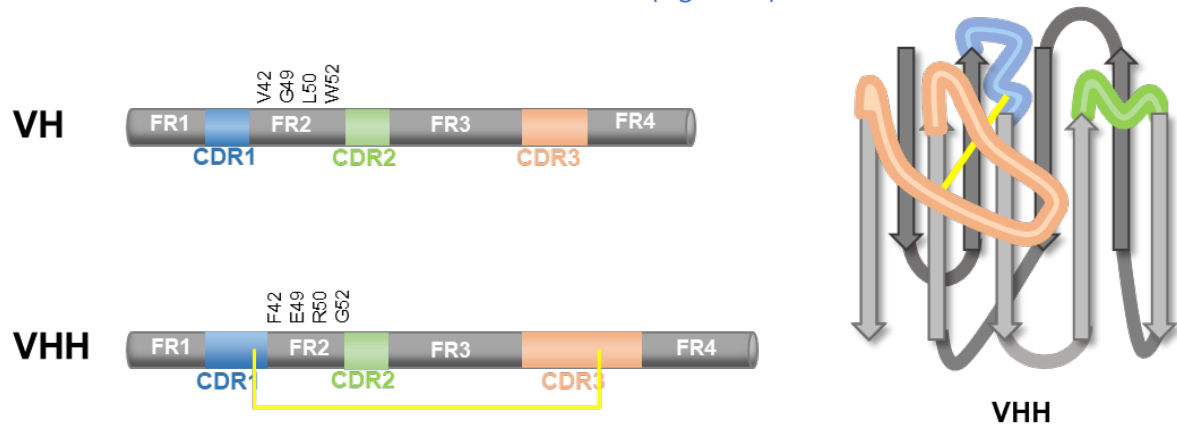


Figure 15: Structure des VHs et des VHHs

Les VHs et les VHHs sont composés des 4 régions constantes 'Framework' (FR1-4) et de 3 régions variables 'Complementarity Determining Region' (CDR1-3). Dans les VHHs un pont disulfure supplémentaire (en jaune) stabilise le CDR3.

Dans le FR2, un changement d'acides aminés hydrophobes dans les VHs (Val42, Gly49, Leu50, Trp52) pour des acides aminés plus petits ou hydrophiles dans les VHHs (Phe42, Glu49, Arg50, Gly52) est observé. Cette région est impliquée dans l'interaction entre les domaines VH et VL dans les anticorps conventionnels (Chothia et al., 1985). Ainsi, aucune interaction entre les domaines VH et VL n'est possible dans les VHHs. Cela permet d'éviter leur agrégation en absence de VL et augmente leur solubilité (Spinelli et al., 1996).

Une autre différence de structure entre les VHs et les VHHs se trouve dans la taille des domaines variables. Les anticorps conventionnels ont six CDR grâce à la combinaison des domaines léger et lourd, là où les VHHs n'en possèdent que trois. Cependant, le CDR3 est plus grand dans les VHHs, donnant une forme de doigt au paratope (Muyldermans et al., 1994; Vu et al., 1997). Cette structure est stabilisée par une cystéine supplémentaire dans les CDR1 et CDR3 qui va former un pont disulfure additionnel (Govaert et al., 2012). La conformation des CDR des VHHs leur confère une plus grande flexibilité et permet une liaison à des épitopes moins accessibles à des IgGs conventionnelles comme des sites actifs dans les sillons des enzymes (De Genst et al., 2006; Lauwereys et al., 1998; Spinelli et al., 2000; Unger et al., 2015) ou des régions concaves de protéines (Khamrui et al., 2013; Schmitz et al., 2013). Ils peuvent également

stabiliser des conformations actives ou inactives de récepteurs couplés aux protéines G (W. Huang et al., 2015; Rasmussen et al., 2011) ou de GTPase (Keller et al., 2019; Y. Zhang, Cheng, et al., 2022) permettant une étude structurelle de leur mécanisme.

En complément de ces caractéristiques de solubilité et de reconnaissance d'épitope, les VHHs présentent une affinité de l'ordre du nanomolaire comparable à celle des anticorps (Arbabi Ghahroudi et al., 1997; Muyldermans, 2013). Ils ont également des propriétés de stabilité supérieures à la plupart des fragments d'anticorps. Leur température de dénaturation se situe généralement entre 60°C et 80°C mais certains peuvent supporter des températures allant jusqu'à 90°C (van der Linden et al., 1999). Ils résistent également à de fortes concentrations de dénaturants chimiques et à des pressions élevées (Dumoulin et al., 2002) et peuvent rester à -20°C ou à 37°C pendant plusieurs semaines sans perdre leurs propriétés (Arbabi Ghahroudi et al., 1997).

Plusieurs paramètres des VHHs leur permettent d'avoir une immunogénicité limitée: leur homologie avec les séquences des immunoglobulines humaines, leur clairance sanguine rapide, leur petite taille qui réduit le nombre d'épitopes potentiellement immunogéniques, leur solubilité qui allège le potentiel de création d'agrégats immunogéniques (Klarenbeek et al., 2015; Rossotti et al., 2022). Cependant, ils restent des protéines étrangères pour le système immunitaire humain et peuvent induire une réaction immune. Une 'humanisation' des VHHs par l'introduction de séquence humaine dans les FR est une stratégie permettant de réduire ce risque (Moutel et al., 2016; Saerens et al., 2005; Vincke et al., 2009).

PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	Anticorps			
	monoclonal	FAB	ScFv	VHH
TAILLE	150 kDa	Environ 50 kDa	30-35 kDa	12-15 kDa
DIAMETRE X LONGUEUR	10-15 x 10 nm	15,9 x 0,95 nm	2 x 3 nm	1 x 2,5 nm
DEMI-VIE DANS LE SANG	Plusieurs jours	7,2 – 19,2 h	< 1h	<< 1h
SOLUBILITE DANS L'EAU	+	+	+	+++
STABILITE	++	++	+	+++
PENETRATION DU TISSU	+	+	++	+++
DIVERSITE DU PARATOPE	+	+	++	+++
FACILITE DE CONSTRUCTION DE LIBRAIRIES	+	+	++	+++
FACILITE D'EXPRESSION	+	+	+	+++

Tableau 1: Comparaison des propriétés physico-chimiques des anticorps et des différents types de fragments d'anticorps *Adapté de (L. Liu et al., 2025)*

5.2.3. Sélection et production des VHHs

Il existe plusieurs techniques pour sélectionner les VHHs, la plupart basées sur une méthode de présentation sur phages.

Les banques immunes consistent à l'immunisation d'un camélidé avec l'antigène cible. Les ARNm des lymphocytes B de l'animal sont extraits. Les ADN complémentaires des VHHs sont identifiés et amplifiés par RT-PCR puis transfectés dans des phages qui vont les exposer à leur surface externe. Une sélection de VHHs spécifiques est alors réalisée sur l'antigène immobilisé (Arbabi Ghahroudi et al., 1997). Ce processus est assez rapide. De plus, les banques immunes étant basées sur la réponse immunitaire naturelle, elles présentent des nanocorps avec une affinité et une spécificité élevées pour l'antigène cible (Zhu & Ding, 2025). Cependant elles nécessitent une grande quantité d'antigène et ont recours aux animaux.

Une stratégie alternative est l'utilisation de banques naïves. Elles sont basées sur le répertoire naturel d'animaux non-immunisés depuis lesquels les HCABs sont extraits depuis leur ARNm et clonés pour une exposition sur phage (Olichon & de Marco, 2012). Cette banque permet une grande diversité due au répertoire naturel et permet une sélection initiale large intéressante lors de l'exploration de nouvelle cible ou d'épitopes non caractérisés (Sabir et al., 2014). Cependant, l'animal n'étant pas immunisé, l'affinité pour l'antigène cible est relativement basse, nécessitant plusieurs cycles de sélection.

L'utilisation de banques synthétiques permet de s'affranchir des animaux. Elles utilisent des séquences d'ADN artificiellement construites, notamment en introduisant des variations dans des régions spécifiques comme le CDR3, et présentent un degré de diversité pouvant contenir 10^{10} variants, soit environ cent fois plus que les répertoires naturels (McMahon et al., 2018; Moutel et al., 2016; Yan et al., 2014; Zimmermann et al., 2018).

La taille et la complexité des MPT des anticorps conventionnels imposent des méthodes de production longues et coûteuses dans des cellules eucaryotes. La structure des nanocorps leur permet d'être exprimé par des bactéries (Arbabi-Ghahroudi et al., 2005; Matsuzaki et al., 2022), des cellules de mammifères (Agrawal et al., 2012) ou même par des plantes (Malaquias et al., 2021). Parmi ces possibilités la production par la bactérie *Escherichia coli* est la plus utilisée et permet une production sous forme soluble, notamment grâce à l'augmentation de l'hydrophilie du FR2 (Osaki et al., 2018).

La diversité des banques de sélection des VHHs, leur stabilité ainsi que leur production rapide, à grande échelle et à moindre coût leur a permis de devenir des outils prometteurs dans de nombreuses applications.

5.2.4. Utilisation en clinique

La société AbLynx, aujourd'hui filiale de Sanofi, initie en 2008 le premier essai clinique d'un nanocorps à visée thérapeutique : le Caplacizumab, qui est également le premier à obtenir une autorisation de mise sur le marché en 2018 comme traitement contre l'aTTP ('acquired thrombotic thrombocytopenic purpura') (Peyvandi et al., 2016; Scully et al., 2019). Il est composé de deux VHHs humanisés identiques reliés par un peptide de liaison. Ces VHHs ont été développés pour cibler le facteur Willebrand et inhiber son interaction avec les plaquettes (Ulrichs et al., 2011).

Depuis, deux autres nanocorps ont été mis sur le marché pour des applications en oncologie. L'Envafolimab est un VHH ciblant PD-L1 (programmed death ligand 1) fusionné à un fragment Fc d'IgG1 humaine pour prolonger sa demi-vie (F. Zhang et al., 2017). L'Envafolimab est la première immunothérapie du complexe PD-1/PD-L1 à pouvoir être administrée par injection sous-cutanée dans le traitement de plusieurs tumeurs solides (J. Li et al., 2021; Papadopoulos et al., 2018). Le Ciltacabtagene autoleucel est un VHH utilisant la stratégie de lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T) ciblant l'antigène de maturation des lymphocytes B, surexprimé dans les cas de myélome multiple (Goel et al., 2025; Shah et al., 2020).

Le dernier VHH approuvé à ce jour est l'Ozoralizumab contre l'arthrite rhumatoïde. Il est le premier nanocorps trivalent autorisé sur le marché et est constitué de deux VHHs : le premier se liant au facteur de nécrose tumorale α avec une affinité de l'ordre du picomolaire et le second ciblant l'albumine sérique afin d'augmenter sa demi-vie plasmatique (Tanaka, 2023).

Plusieurs dizaines d'autres VHHs sont en cours d'études cliniques pour le traitement de cancer, de maladies inflammatoires, de pathologies vasculaires... (L. Liu et al., 2025). Concernant les maladies neurodégénératives, un seul VHHs a atteint le stade des essais cliniques : le B1-1034020 de la compagnie Boehringer Ingelheim (NCT01958060). Bivalent, il cible deux épitopes du peptide β -amyloïde (A β 40 et A β 42) (J. Ma et al., 2021). La phase I a été suspendue en 2013 pour cause d'événements indésirables, il n'y a aucune communication concernant un futur essai clinique.

5.2.5. Développement des VHHs dans la recherche contre les tauopathies

Grâce à leurs nombreux avantages, les nanocorps sont de plus en plus développés pour étudier les maladies neurodégénératives. Leur petite taille et leurs propriétés physico-chimiques améliorent leur

pénétration dans le tissu cérébral. Ainsi, ils sont développés comme outils d'études structurales ou fonctionnelles (De Leiris et al., 2024; Godoy Muñoz et al., 2024; Ishizuka et al., 2022; Joensuu et al., 2016; McArthur, Kang, et al., 2024; McArthur, Squire, et al., 2024; Schenck et al., 2017; Zupancic et al., 2023) ou de microscopie à très petite échelle ou sur organe complet transparisé (Cai et al., 2019; Queiroz Zetune Villa Real et al., s. d.; Yamauchi et al., 2025). Ils peuvent également être conçus pour développer des diagnostics de la MA à partir de fluides biologiques (Habiba et al., 2021; Monti et al., 2023).

Leur capacité à passer la BHE a permis d'élaborer de nouveaux traceurs d'imagerie cérébrale dirigés contre le peptide A β (T. Li et al., 2016; Nabuurs et al., 2012; Pansieri et al., 2017; Vandesquille et al., 2017) ou contre la protéine tau (Jiang et al., 2023; T. Li et al., 2016) en cours d'essais pré-cliniques.

En effet, plusieurs VHHs dirigés contre la protéine tau ont été développés récemment (Tableau 2). Certains ont permis une diminution de l'entrée de la protéine tau dans des cultures primaires de neurones (Danis et al., 2025) ou une réduction de la nucléation dans un modèle cellulaire (Abskharon et al., 2023; Danis et al., 2022). Une étude dans un modèle transgénique de drosophile a permis de mettre en évidence une amélioration sur les phénotypes de la pathologie tau comme la survie, la locomotion, la rugosité oculaire, l'intégrité neuronale suite à l'expression de VHH ciblant le domaine de liaison aux microtubules de la protéine tau (Nair et al., 2024) ; le même VHH ayant montré un potentiel à abaisser la quantité de protéine tau en microdialyse chez la souris (Congdon et al., 2022).

L'équipe d'Isabelle Landrieu a été une des premières à développer des nanocorps ciblant la protéine tau. Une sélection avec la société Hybrygenics sur une banque synthétique de phages exposant des VHHs humanisés de lamas a permis de trouver une vingtaine de candidats (Moutel et al., 2016). Dans un premier temps, la collaboration avec le laboratoire a permis la caractérisation de F8-2. Celui-ci a pour épitope le domaine carboxy-terminal ($_{373}$ THKLTF $_{378}$), a une expression intracellulaire stable et peut détecter la protéine tau dans les tissus cérébraux (Dupré et al., 2019). Très récemment, l'association de ce VHH avec un système d'adressage au protéasome a permis la réduction de la pathologie tau dans un modèle transgénique murin (Benn et al., 2024).

VHH		FUSION	EPITOP E	SELECTION	MODELE D'ETUDE	PASSAG E BHE	EFFET SUR LA PATHOLOGIE TAU
A2		Fluo tag	Cter	Banque immune (alpaga)	Souris (imagerie)	Oui	-
F8-2			Cter	Banque synthétique humanisée (lama)	Immuno- marquage	-	-
1D9			MTBR	Banque immune (lama)	Souris	-	-
2B8			MTBR			-	Diminue la quantité de tau en microdialyse
Z70		Fluo tag	PHF6	Banque synthétique humanisée (lama)	Cellules et souris	-	Diminue la nucléation <i>in vitro et in vivo</i>
WIW		VHH IGF1R	PHF6	Modélisation synthétique	Cellules et souris	Oui	Diminue la nucléation <i>in vitro</i>
2B8		Fluo tag	MTBR	Banque immune (lama)	Souris (imagerie)	Oui	-
WA2.22		Fc	Confor mation	Banque immune (lama)	Immuno- marquage	-	-
F8-2		TRIM21 RING	Cter	Banque synthétique humanisée (lama)	Souris	-	Diminue la pathologie tau du modèle transgénique
2C5		Radioliga nd	MTBR	Lama immunisé	Souris	Non	-
MT3.1		Fc	MTBR	Banque immune (lama)	Immuno- marquage	-	-
OT2		Fc	Oligom ères	Banque immune (lama)	Immuno- marquage	-	-
2B8			MTBR	Banque immune (lama)	Drosophil e	-	Diminue la pathologie tau du modèle transgénique
1D9			MTBR			-	
A31			PHF6*	Banque synthétique humanisée (lama)	Cellules	-	Bloque l'entrée dans les neurones
Z70mut 1			PHF6			-	
E2-2			Cter			-	
H3-2			Cter			-	

Tableau 2: Liste des VHHs ciblant la protéine tau

Cter : domaine carboxy-terminal, MTBR : domaine de liaison aux microtubules, Fluo tag : protéine fluorescente fusionnée au VHH

Le E4-1 est un autre VHH issu de cette sélection. Ce nanocorps a pour épitope l'hexapeptide PHF6 (306VQIVYK311) localisé dans la troisième répétition du domaine de liaison au microtubule; région impliquée dans la formation des agrégats de protéines tau (Ganguly et al., 2015; von Bergen et al., 2000, 2001). Le E4-1 ne présentant pas d'activité intracellulaire à reconnaître sa cible, une optimisation

par mutagénèse a abouti au VHH Z70. Ce dernier présente quatre mutations dans les FR (G12V, P16S, T81M et W114G) et de meilleures solubilité et activité intracellulaires que son parent E4-1. Le Z70 reconnaît toujours l'épitope PHF6 (Figure 16a) et diminue la polymérisation de la protéine recombinante induite par l'héparine (Figure 16c). Il inhibe la formation d'agrégats dans les cellules rapporteuses de la nucléation par signal de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) (Figure 16d). Enfin, le Z70 a été testé dans un modèle de nucléation *in vivo* précédemment validé (Albert et al., 2019). Il consiste à induire la nucléation par injection stéréotaxique de lysat de cerveau de patients atteints de MA dans des souris transgéniques pour *MAPT*. Lorsque le VHH Z70 est exprimé en amont via un vecteur lentiviral par une injection intra-crâniale, il réduit la quantité de pathologie tau dans ce modèle (Figure 16e) (Danis et al., 2022). Ainsi le VHH Z70 possède des capacités de réduction de la nucléation de la protéine tau, suggérant un potentiel thérapeutique.

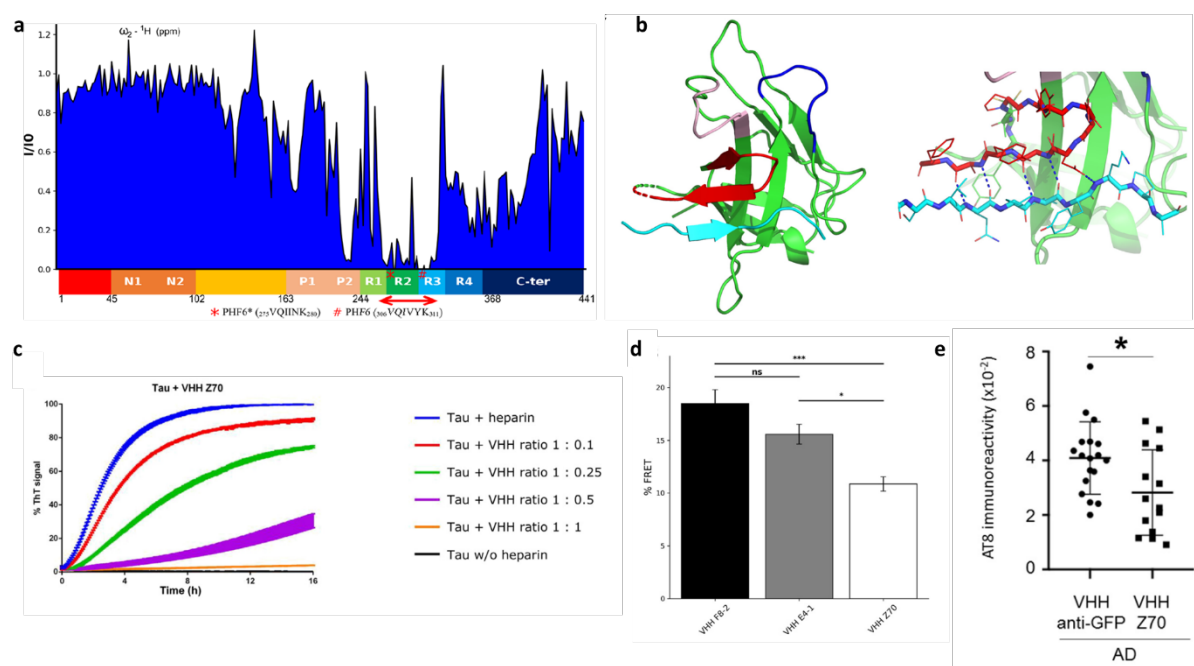


Figure 16: Epitope et effets du VHH Z70

(a) Identification de la région de liaison du VHH Z70 sur la protéine tau 2N4R par résonance magnétique nucléaire. **(b)** Structure cristalline du complexe entre le VHH Z70 et le peptide PHF6. Les régions FR sont colorées en vert, les CDR1, CDR2 et CDR3 en rose, bleu marine et rouge respectivement, le peptide PHF6 en bleu cyan. A droite, la figure représente les 5 liaisons hydrogène entre les 2 molécules. **(c)** Agrégation de la protéine tau en absence d'héparine (noir) ou en présence d'héparine avec des concentrations croissantes du VHH Z70 quantifiées par la fluorescence de la Thioflavine T. **(d)** Nucléation de la protéine tau dans les cellules rapportrices HEK293 Tau RD P301S FRET. Pourcentage de cellules positives en signal FRET dans les cellules transfectées avec différents VHHs. **(e)** Quantification de l'immunomarquage AT8 sur coupes de cerveaux de souris THY-Tau30 injectées dans l'hippocampe avec les vecteurs lentiviraux exprimant un VHH contrôle ou le VHH Z70 puis avec un lysat de cortex de patients atteint de MA. Adapté de (Danis et al., 2022)

OBJECTIFS DE THESE

Les tauopathies sont des maladies neurodégénératives hétérogènes touchant un grand nombre de personnes. Elles ont en commun la présence d'agrégats intracellulaires de protéine tau. La présence de ces derniers dans certaines régions du SNC est corrélée avec les symptômes des pathologies. De plus, dans certaines tauopathies, la protéine tau pathologique est retrouvée dans le liquide interstitiel et peut propager la pathologie de cellule en cellule. Elle est donc considérée comme une cible thérapeutique idéale. L'immunothérapie, par sa spécificité de ciblage, représente un espoir de traitement contre les tauopathies. Son optimisation par l'utilisation des VHHs permettrait de cibler plus efficacement la protéine tau intracellulaire.

Les résultats encourageants du VHH Z70 développé au laboratoire conduisent à l'étude plus poussée de son potentiel thérapeutique et ouvrent la voie à plusieurs questions. Bien que le VHH Z70 fut le premier VHH à démontrer un effet sur la nucléation de la protéine tau, cette étude présente plusieurs limites. Une évaluation des effets du traitement sur l'ensemble du SNC et à plus long terme n'est pas permise par le modèle de nucléation *in vivo* et l'utilisation de vecteurs lentiviraux. Cependant, l'étude des effets spatiaux et temporels prolongés soulève la question de la sécurité dans ces conditions d'exposition accrue. En effet, le PHF6 n'est pas un épitope spécifique de la protéine tau pathologique et il reste à démontrer que les VHHs anti-tau n'affectent pas le fonctionnement cérébral.

Le potentiel thérapeutique des VHHs ne se limitent pas au ciblage de protéine au sein de la cellule. Ils peuvent également être adressés dans le liquide interstitiel pour y capturer la protéine tau et ainsi diminuer la propagation de la pathologie. Le laboratoire a de ce fait développé une construction du Z70 avec une séquence de sécrétion et fusionné à un fragment Fc d'IgG pour un ciblage de la protéine tau extracellulaire. L'addition du fragment Fc permet également d'augmenter la stabilité et le temps de demi-vie du VHH (Godakova et al., 2019; Rath et al., 2015; Rotman et al., 2015). De plus, de par sa liaison aux récepteurs Fc exprimés par la microglie, ce VHH activerait la dégradation de la protéine tau présente dans le liquide interstitiel.

La comparaison des approches de ciblage de la protéine tau intra ou extracellulaire par les VHHs aiderait à la compréhension de leurs mécanismes d'action afin d'envisager l'utilisation des outils dans un cadre thérapeutique. Dans ce contexte, trois objectifs de thèse sont mis en évidence : 1) le développement des outils, 2) l'évaluation de leur sécurité et 3) de leur efficacité.

Le premier objectif consiste à valider les outils. La localisation cellulaire des VHHs intra et extraZ70 est une validation primordiale pour ce projet afin de permettre la prise en charge de la protéine à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. De même, dans le cadre d'une thérapeutique, l'expression de nos constructions la plus étendue dans le SNC est requise. Enfin, la caractérisation de l'expression de nos VHHs *in vivo* sera réalisée.

Le deuxième objectif concerne la sécurité des vecteurs viraux AAV exprimant les VHHs anti-PHF6. Elle sera analysée de manière approfondie à l'aide de plusieurs tests complémentaires. L'évaluation des fonctions cognitives et motrices, de l'intégrité neuronale et des cellules gliales sera réalisée à l'aide d'animaux sauvages.

Nous testerons enfin l'efficacité du ciblage chronique de la protéine tau dans le compartiment intracellulaire (intraTau) ou dans l'espace extracellulaire (extraTau) sur différents aspects de la pathologie. Afin d'être plus proche du vieillissement, cette analyse à long terme sera réalisée sur un modèle transgénique murin de tauopathie dans lequel plusieurs critères d'évaluation, basés sur le phénotype du modèle de tauopathie, seront évalués: les fonctions motrices et cognitives, le volume cérébral et les lésions tau.

MATERIELS ET METHODES

1. Construction des VHHs

Un screening contre une protéine tau recombinante 2N4R a été réalisé sur une librairie synthétique de phage-display d'anticorps à domaine unique humanisé de lama nommée Nali-H1 (Moutel et al., 2016). Une vingtaine de clones ont été sélectionnés dont le VHH nommé E4-1 reconnaissant l'épitope PHF6₃₀₆VQIVYK₃₁₁. E4-1 a été optimisé par mutagenèse pour améliorer sa stabilité et son affinité. Le VHH obtenu est nommé Z70 (Danis et al., 2022). Pour une expression intracellulaire, les VHHs Z70 et contrôles (VHH dirigé contre la protéine GFP 'Green Fluorescent Protein') sont produits à partir de leur ADNc fusionné à la partie carboxy-terminale (C-ter) avec une protéine rapportrice mCherry (intraZ70 ou intraCtrl). Pour une localisation extracellulaire, les plasmides codent pour les VHHs Z70 ou contrôle sont fusionnés en C-ter avec le fragment Fc d'immunoglobuline IgG2a de souris et en N-ter avec une séquence de sécrétion de l'interleukine 2 (IL2ss) (Moutel et al., 2009) (extraZ70 ou extraCtrl).

2. Culture cellulaire

2.1. Transfection des cellules

Les cellules HEK-293T sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % GlutaMAX et 1 % d'antibiotiques (Penicilline/Streptomycine). Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à 800 000 cellules par puits. Le lendemain, elles sont transfectées avec 500 ng de plasmides codant pour le VHH intraZ70, intraCtrl, extraZ70 ou extraCtrl avec de la Lipofectamine dans de l'OptiMEM suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen). 48h plus tard, le milieu est collecté et les cellules sont lysées dans un tampon RIPA 1X (150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% NP-40, acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) free protease inhibitor, 50 mM Tris base, pH 8) et homogénéisées par sonication.

2.2. Modèle de nucléation *in vitro*

Les cellules Tau RD P301S FRET (CRL-3275, ATCC) sont des biosenseurs dérivés des HEK-293T exprimant des domaines de liaisons aux microtubules de la protéine tau fusionnés à la CFP (Cyan Fluorescent Protein) ou à la YFP (Yellow Fluorescent Protein). Elles sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules HEK-293T. Pour effectuer un test de nucléation, elles sontensemencées en plaques 12 puits à 150 000 cellules / puit. Les lysats d'hippocampes sont dilués à 0,1 µg/µL. Le contrôle positif est

composé de fibres de protéine tau à 2µM. Le lendemain, les échantillons sont incubés 20 minutes dans un agent de lipofection (Lipofectamine 2000, Invitrogen) dilués au 1/10^e dans du milieu essentiel minimal réduit en sérum de veau foetal (OPTI-MEM 31985062, Gibco) puis appliqués sur les cellules. 72h plus tard, les cellules sont décollées avec du tampon phosphate salin (PBS) à 37°C puis incubées 30 minutes avec un marqueur de cellules mortes (Zombie NIR™, Biolegend, 1/400^e). Après un rinçage au PBS, les cellules sont fixées 10 minutes dans du paraformaldéhyde (PAF) à 2%. Après un nouveau rinçage, les cellules sont suspendues dans du PBS. La fluorescence est alors quantifiée par un analyseur spectral (SP6800, Sony). Les données ont été quantifiées à l'aide du logiciel KALUZA (Beckman Coulter).

3. Vecteurs viraux

3.1. Sélection des sérotypes d'AAV

Pour les tests de sérotypes d'AAVs et de sites d'injection, le génome de l'AAV2 a été combiné avec la capsid de quatre sérotypes décrits comme ayant un tropisme pour le SNC donnant l'AAV2/7, l'AAV2/8, l'AAV2/9 et l'AAV 2/10. Ils expriment la protéine fluorescente verte (GFP) sous le promoteur ubiquitaire du cytomégalo virus humain (CMV). Le vecteur est flanqué de séquences répétées inversées (ITR) de l'AAV2 permettant sa recombinaison dans le génome viral. Une séquence Kozak permet de faciliter l'initiation de la traduction, un signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (pA) entraîne l'arrêt de la traduction et la polyadénylation de l'ARNm, enfin, une séquence WPRE (Woodchuck Hepatitis virus Posttranscriptional Regulatory Element) augmente l'expression du transgène. Ces vecteurs viraux ont été produits par la compagnie VectorBuilder.



Figure 17: Composition des vecteurs viraux exprimant la GFP

3.2. Modélisation chronique

Pour le modèle *in vivo* chronique, le génome de l'AAV2 combiné avec la capsid de l'AAV9 exprime les VHHs Z70 ou contrôle fusionné à la protéine rapportrice mCherry (Figure 18a) pour les constructions d'intraVHH. Les extraVHHs sont les mêmes vecteurs viraux contenant une séquence de sécrétion IL2ss et exprimant les VHHs Z70 ou contrôle fusionné à un fragment Fc d'IgG2a de souris (Figure 18b). L'ensemble de ces vecteurs ont été produits par la compagnie VectorBuilder.

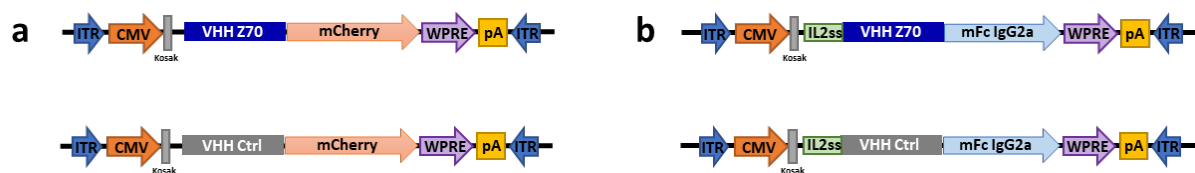


Figure 18: Composition des vecteurs viraux exprimant les intra ou les extraVHHs

3.3. Modèle de seeding

Les vecteurs lentiviraux sont pseudotypés avec la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) pour favoriser le transfert de gène. L'ADN encodant les intraCtrl, intraZ70, extraCtrl ou extraZ70 sont clonés dans un système de vecteur GATEWAY (Invitrogen) permettant la recombinaison dans un vecteur lentiviral contenant le promoteur ubiquitaire de la phosphoglycérate kinase (PGK) ainsi qu'une séquence WPRE.

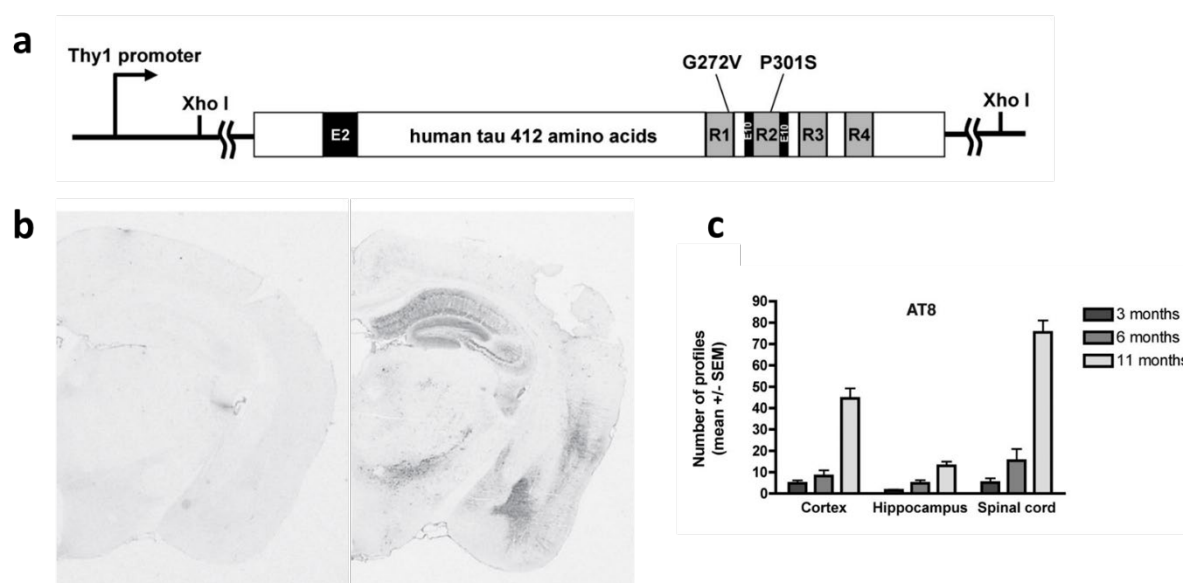
Les vecteurs lentiviraux sont produits via les cellules HEK293Tensemencées sur plaques à $4 \cdot 10^6$. Le lendemain, elles sont transfectées avec 13 μg d'ADN du transgène, 13 μg de plasmide pCMV Δ R8.93, 3 μg de plasmide pRSV-Rev et 3,75 de plasmide pMD.2G selon un protocole de précipitation de l'ADN avec du phosphate de calcium. Le milieu est changé 6h après la transfection. 48h plus tard, le surnageant est récolté, filtré et centrifugé à 30 000 g puis à 60 000 g. Le culot est repris dans du PBS avec 1% d'albumine sérique bovine. Le titre en particules virales est obtenu par un dosage ELISA de la protéine p24 de la capsid (Gentaur).

4. Animaux

4.1. Lignée transgénique

Pour la modélisation des tauopathies, le modèle de souris transgéniques Tg(Thy1-*MAPT*^{*})30Schd (Tg30) a été choisi. L'ADN complémentaire (ADNc) de l'isoforme 1N4R du gène *MAPT* humain a été modifié pour introduire une séquence Kosak et deux mutations dans les domaines de liaisons aux microtubules G272V et P301S, retrouvées dans des FTDP-17 (Hutton et al., 1998). L'ADNc est sous le contrôle d'un promoteur neuronal Thy1.2 (Figure 19a) et la construction a été introduite dans une souche C57Bl/6 (Schindowski et al., 2006). Le transgène est exprimé dans le cerveau et la moelle épinière (Schindowski et al., 2006). Une hyperphosphorylation de la protéine tau et la présence de PHF

a été décrite dans l'hippocampe, le cortex et la moelle épinière et progresse avec l'âge (Figure 19b et c). Ces animaux présentent une atrophie cérébrale, une perte axonale et un déficit moteur des membres postérieurs (Leroy et al., 2007). Ce phénotype réduisant la survie des animaux à une moyenne de 12 mois, les souris Tg30 ne sont pas utilisées après 11 mois pour le bien-être animal. Pour cette étude, les animaux sont issus du croisement d'un mâle hétérozygote Tg30 et d'une femelle C57Bl/6. Les animaux sont sevrés entre 21 et 25 jours puis génotypés via une biopsie de la queue. Les souris Tg30 sont uniquement les animaux hétérozygotes et leurs contrôles de portées sont désignés Wild Type (WT). Les animaux sont hébergés dans une animalerie exempte de pathogène spécifique avec une température (20 à 22 °C), une hygrométrie et un cycle jour/nuit (12h/12h) contrôlés et un accès à la nourriture et à l'eau à volonté. Ces études ont été approuvées par un comité d'éthique et



par le ministère chargé de la recherche (numéro APAFIS #43474).

Figure 19: Transgène et phénotype d'expression de tau dans les souris Tg30

(a) Transgène codant la protéine tau humaine 1N4R avec les mutations G272V et P301S cloné grâce à des sites XhoI sous le contrôle d'un promoteur d'expression Thy1.2. **(b)** Immunomarquage de la protéine tau phosphorylée par l'anticorps AT8 sur des coupes de cerveaux de souris WT (gauche) ou Tg30 (droite) âgées de 12 mois. **(c)** Quantification des neurones positifs au marquage AT8 dans le cortex, l'hippocampe et la moelle épinière à 3, 6 ou 11 mois. Adapté de (Leroy et al., 2007; Schindowski et al., 2006)

4.2. Modèle chronique

Pour l'étude à long terme de l'innocuité et de l'efficacité des intra et extraZ70, à l'âge d'un mois, les souris Tg30 sont injectées dans les hippocampes avec les vecteurs AAV2/9 exprimant les VHHs intraCtrl, intraZ70, extraCtrl ou extraZ70. Les souris WT sont injectées avec les vecteurs AAV2/9

exprimant les VHHs intraZ70 ou extraZ70. Les contrôles sont composés de vecteurs AAV2/9 vides ou d'un vecteur 2/9 exprimant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein).

WT		Tg30	
AAV	Nombre	AAV	Nombre
AAV2/9 vide	15	intraCtrl	15
GFP	15	intraZ70	15
intraZ70	15	extraCtrl	15
extraZ70	14	extraZ70	15

Tableau 3: Répartition des animaux pour la modélisation chronique

A 8 mois, des tests moteurs et comportementaux sont réalisés avant qu'une série d'imagerie cérébrale comportant de l'IRM et de la TEP soit réalisée. Une surveillance mensuelle de leur poids et de la position des membres inférieurs a lieu jusqu'à leur sacrifice à l'âge de 10 mois.

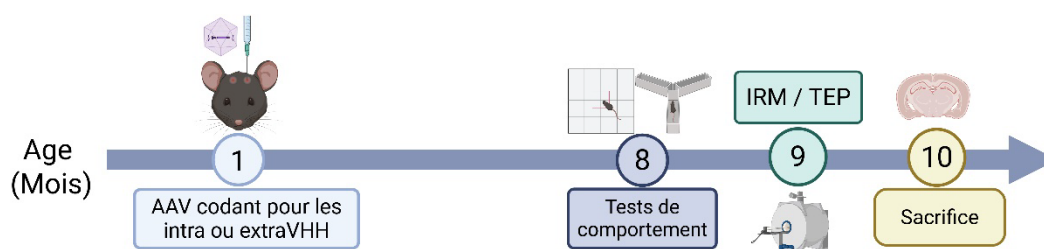


Figure 20: Schéma expérimental de la modélisation chronique

4.3. Modèle de nucléation *in vivo*

Pour l'étude des VHHs dans un modèle de la nucléation *in vivo*, le protocole est basé sur un modèle déjà publié par le laboratoire (Albert et al., 2019; Danis et al., 2022). Les animaux Tg30 sont injectés dans l'hippocampe à l'âge d'un mois avec un vecteur lentiviral exprimant le VHH intraCtrl, intraZ70, extraCtrl ou extra Z70. Deux semaines plus tard, les animaux reçoivent une injection aux mêmes coordonnées de lysat de cerveau de patient au stade Braak VI de la MA. Après un mois, les animaux sont sacrifiés.

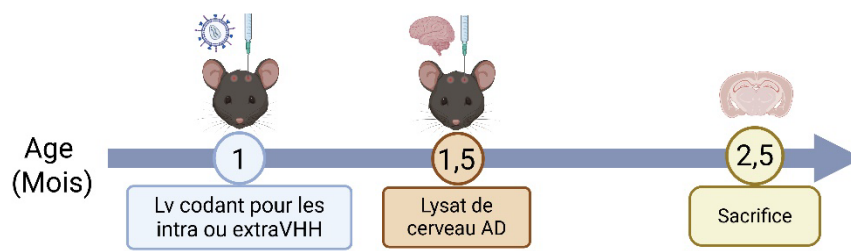


Figure 21: Schéma expérimental de la modélisation de nucléation in vivo

5. Injections stéréotaxiques

Les animaux sont anesthésiés par injection intra-péritonéale d'un mélange de Kétamine (100mg/kg) et de Xylazine (10mg/kg) suivie d'une anesthésie locale du scalp par de la Lidocaïne. Pour la sélection des sérotypes de vecteurs AAV, les souris Tg30 âgées d'un mois reçoivent une injection bilatérale dans l'hippocampe aux coordonnées depuis le bregma antéro-postérieure (AP) : -2,5 ; médio-latérale (ML) : +/- 1 ; dorso-ventrale (DV) : -1,8 ou dans le ventricule cérébral : AP : -0,4 ; ML : +/-1 ; DV : -2,2. Les vecteurs AAV de sérotypes 2/7, 2/8, 2/9 ou 2/10 exprimant la GFP sous un promoteur ubiquitaire du cytomégalo virus (CMV) (VectorBuilder) sont injectés à $1,5 \cdot 10^{13}$ copies de génome/mL dans 2 μ L à un débit de 250 nL/min dans une seringue en verre (Hamilton). Pour éviter toute douleur post-opératoire, une injection sous-cutanée d'antalgique est réalisée (Buprénorphine 0,1 mg/kg). Pour les tests chroniques d'innocuité, des souris WT de un mois sont injectées bilatéralement dans l'hippocampe : AP : -2,5 ; ML : +/-1 ; DV : -1,8 avec des vecteurs AAV2/9 exprimant la protéine GFP, l'intraZ70, l'extraZ70 ou avec des vecteurs AAV2/9 vides. Pour les tests chroniques d'efficacité, les souris Tg30 d'un mois sont injectées bilatéralement dans l'hippocampe avec des vecteurs AAV2/9 exprimant l'intraCtrl, l'intraZ70, l'extraCtrl ou l'extraZ70. Pour le modèle de nucléation, les animaux d'un mois sont injectés bilatéralement dans l'hippocampe avec des vecteurs lentiviraux exprimant l'intraCtrl, l'intraZ70, l'extraCtrl ou l'extraZ70 à 200 ng/ μ L dans 2 μ L. Deux semaines plus tard, 2 μ L d'un homogénat de cerveau MA sont injectés aux mêmes coordonnées.

6. Tests comportementaux

6.1. Test des membres inférieurs

Les souris Tg30 développant des troubles moteurs des membres postérieurs avec l'âge (Schindowski et al., 2006), une échelle d'évaluation de la paralysie des pattes postérieures a été créée pour cette étude (Figure 22). Tous les mois, les animaux sont suspendus quelques secondes par la queue et la position des pattes est analysée ; les animaux Tg30 âgés positionnant leurs membres postérieurs rétractés près de l'abdomen.

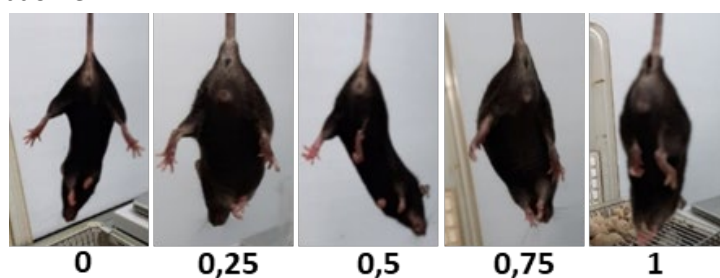


Figure 22: Test de la paralysie des membres postérieurs

La valeur 0 correspond à une position physiologique, 1 est une atteinte maximale et les valeurs 0,25, 0,5 et 0,75 sont les intermédiaires (atteinte unilatérale, position intermédiaire).

6.2. Champ ouvert

Sept mois après les injections stéréotaxiques, l'activité motrice et le comportement anxieux sans stimuli de prédateur sont testés dans un labyrinthe à champ ouvert composé d'une arène de 49 x 49 cm dans une luminosité de 60 lux. Les parois en plastique sont nettoyées à l'éthanol 30° avant chaque test. Les souris sont placées au centre de l'arène et sont libres d'explorer la zone pendant dix minutes. Le mouvement des animaux est enregistré par le logiciel Ethovision XT (Noldus). La locomotion est mesurée grâce à la distance parcourue et la vitesse de déplacement de l'animal. L'anxiété est représentée par le thigmotactisme : le temps passé dans la zone interne de l'arène (Centre) est comparé au temps passé près des murs (Périphérie).

6.3. Labyrinthe en Y

Sept mois après les injections, la mémoire spatiale des animaux est testée dans un le labyrinthe en Y. Le labyrinthe est composé de trois bras de 22 cm de long, 6,4 cm de large et 15 cm de profondeur. Le fond des bras est recouvert de litière qui est mélangée avant chaque départ pour éviter toute trace olfactive. Des repères visuels sont placés autour du labyrinthe et les expériences sont réalisées avec

une luminosité de 7 lux. Pendant la phase d'apprentissage, l'animal peut explorer deux bras (le bras départ et le bras autre) librement pendant cinq minutes. L'accès au troisième bras (bras nouveau) est bloqué par une porte opaque. L'assignement du bras de départ varie entre les individus des groupes. Les animaux sont ensuite remis dans leur cage pendant deux minutes. Pendant la phase de test, l'animal est replacé dans le bras de départ et peut explorer les trois bras pendant cinq minutes. Le temps passé dans chaque zone est enregistré avec le logiciel Ethovision XT (Noldus). La distance parcourue et la vitesse de déplacement de l'animal sont calculées sur les cinq minutes d'exploration. La mémoire spatiale est calculée par un indice de discrimination correspondant au temps dans le bras nouveau $\times 100 / (\text{temps dans le bras nouveau} + \text{temps dans bras autre})$ pendant la première minute de la phase de test. Cet indice est comparé à l'exploration aléatoire entre les le bras nouveau et le bras autre, soit 50%.

7. Imagerie cérébrale

7.1. Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Acquisitions :

Les images sont prises sur une IRM 7 Tesla (Bruker, Biospec). Une antenne émettrice cylindrique de 86 mm de diamètre est couplée à une antenne réceptrice adaptée au cerveau de souris pour l'enregistrement des données. L'animal est anesthésié avec 1,5% d'isoflurane et est positionné sur un lit avec un circuit d'eau chaude intégré afin de conserver sa température corporelle. Un capteur est placé sous l'abdomen pour monitorer la respiration et un autre sur la patte pour l'oxygénation et le pouls. La procédure dure environ 1h25 et inclut un total de six séquences. L'imagerie commence par une séquence écho de gradient qui permet le contrôle de la position du cerveau au centre du champ magnétique, une acquisition de 15 images est réalisée (5 images pour chaque plan : axial, coronal et sagittal). Une seconde séquence d'identification 2D est réalisée en écho spin de dix sections coronales de 0,7 mm en T2 pondéré pour le contrôle de l'orientation du cerveau. Les paramètres des séquences sont les suivants : un temps de répétition (TR) de 2500 ms, un temps d'écho (TE) de 33 ms, le champ de vue (Field of view : FOV) est un carré de 2 cm, codé par une matrice de 256 sur 256 soit une résolution de 78 microns par pixel.

A la suite des séquences précédentes, une séquence DTI (Diffusion Tensor Imaging) 2D de 30 coupes axiales de 0,5 mm est appliquée en méthode d'acquisition écho planar (EPI) afin de mesurer les paramètres de mobilité des molécules d'eau, tels que la fraction d'anisotropie (FA), la diffusivité

moyenne (MOY), la diffusivité radiale (RAD) et la diffusivité longitudinale (LONG). Les paramètres de séquences sont les suivants : un TR de 2500 ms, un TE de 30 ms, le FOV est un rectangle de 2,2 x 1,5 cm codé par une matrice de 220 sur 150 soit un pixel de 100 microns de côté. Cette séquence est codée dans 30 directions avec une valeur b de 850s/mm². L'homogénéisation du champ magnétique est obtenue par méthode MAP-SHIM en plaçant un voxel resserré autour du cerveau. En complément, cette séquence DTI est dupliquée en réglant ses paramètres de direction de codage de phase inversés, sans valeur b et codée en une seule direction, afin de corriger en post-traitement les distorsions dues à la méthode EPI de la séquence DTI. Puis une séquence anatomique de pondération T2 recallée géométriquement à la DTI est réalisée avec les paramètres suivants : un TR de 5000 ms, un TE de 33 ms.

Enfin une séquence anatomique 3D du cerveau est acquise dans le but de réaliser les calculs volumiques de structures cérébrales. Elle est de pondération T2 avec un TR de 1800 ms, un TE de 36 ms, le FOV est un voxel de 20 x 15,5 x 12 cm, codé par une matrice de 154 sur 119 sur 92, soit une résolution de 130 microns par pixel.

Traitement des données :

L'inhomogénéité du champ de polarisation est corrigée à partir des images pondérées en T2 à l'aide de l'algorithme N4 (Tustison et al., 2010) puis le bruit de fond des images a été corrigé avec un filtre multirésolution non basée sur les moyennes (Manjón et al., 2010). Le masque du cerveau et la segmentation des régions ont été extraits grâce à une segmentation multi-atlas automatique (D. Ma et al., 2014) et à l'atlas NUS (National University of Singapour) du cerveau de souris (Bai et al., 2012). 39 régions d'intérêt bilatérales ont été récupérées et leur volume calculé. Une méthode de valeurs statistiques de probabilité par voxel a été appliquée pour comparer les volumes de régions cérébrales des souris WT-VLP à ceux des autres groupes en utilisant un test de permutation de Fisher-Pitman.

Pour les images de DTI, le bruit de fond a été réduit en utilisant la technique de OL-PCA (Overcomplete Local Principal Component Analysis) (Manjón et al., 2013). Les images pondérées T2, les masques et les structures segmentées sont enregistrés ensemble sur l'image B0 avec le logiciel SPM12 (UCL Institute of Neurology). Une correction de la distorsion est réalisée par la fonction Eddy du logiciel FSL (Oxford University). Ce logiciel permet également de générer des cartes des différents paramètres de DTI : FA, MD, RD et LD.

7.2. Tomographie à Emission de Positons (TEP)

Le métabolisme cérébral du glucose a été étudié grâce à un TEP-CT (Computed Tomography) scan (Inveon, Siemens). Après une mise à jeun sur la nuit, les animaux reçoivent une injection intrapéritonéale de [18-F]fluorodeoxyglucose (^{18}F FDG, Curium) à 0,5 MBq/g dans 300 μL . 45 minutes plus tard, l'animal anesthésié avec 2% d'isoflurane est placé dans la machine. L'acquisition TEP est de 15 min et l'acquisition CT de 10 min. Les images générées par CT sont extraites et appliquées sur les images TEP grâce au logiciel SPM. La consommation de ^{18}F FDG est exprimée en SUV (Standardized Uptake Value). Les SUV sont extraites des différentes régions cérébrales grâce à l'atlas NUS et normalisées par les valeurs de SUV du cervelet.

8. Sacrifice et prélèvement des tissus

Pour la sélection du sérotype d'AAV et le modèle de nucléation, un mois après les injections stéréotaxiques, les animaux sont anesthésiés avec un mélange de Kétamine (100 mg/kg) et de Xylazine (10 mg/kg). Une perfusion intra-cardiaque est réalisée avec du sérum physiologique (0,9% NaCl) froid puis dix minutes avec du PAF 4%. Le cerveau et la moelle épinière sont retirés et sont post-fixés une nuit à 4°C dans du PAF. Après un lavage au PBS, ils sont incubés une nuit dans une solution de Sucrose 20%, congelés une minute dans de l'isopentane à -40°C puis stockés à -80°C. Des coupes flottantes de 40 μm sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica) en plan coronal pour le modèle de nucléation et en plan sagittal pour la sélection des sérotypes d'AAV. La moelle épinière est déshydratée : éthanol 70° sur la nuit, éthanol 80° 90 min, éthanol 95° 90 min, éthanol 100° 90 min, xylène deux fois 2h, paraffine à 55°C deux fois 90 min puis incluses. Des coupes de 7 μm sont réalisées au microtome (Leica).

Pour le test de stabilité d'expression de l'AAV et le modèle chronique, un ou neuf mois après les injections stéréotaxiques, les animaux sont anesthésiés avec un mélange de Kétamine (100 mg/kg) et de Xylazine (10 mg/kg). Une perfusion intra-cardiaque est réalisée avec du sérum physiologique froid. Le cerveau est retiré et coupé en deux. Un hémisphère est post-fixé 7 jours dans du PAF, lavé au PBS, mis une nuit dans du sucrose 20% et congelé 1 min dans d'isopentane. Des coupes sagittales de 40 μm sont réalisées au cryostat (Leica). L'autre hémisphère est disséqué sur de la glace, l'hippocampe est extrait et stocké à -80°C.

9. Extraction d'ADN et qPCR

Pour une réaction en chaîne par polymérase quantitative (pPCR), un ou neuf mois post-injection, les hippocampes sont lysés par sonication dans 200 μ L de solution de Tris base 10 mM pH 7,4 avec 10% de sucrose. L'ADN est extrait à partir de 15 μ L de lysat avec le kit Nucleospin Tissue XS (Macherey Nagel). Une analyse quantitative en PCR a été réalisée sur 2 μ L à 25 ng/ μ L de l'ADN obtenu, 1 μ M d'oligonucléotides spécifiques des VHHs (amorce sens : ATA CGT AGC TGT GTC CTC GG et amorce anti-sens : GAG TTC GTT TCC GCC ATC TC) dans un mélange commercial SYBRGreen Master (GoTaq Green Master Mix 2X, Promega). Le programme du thermocycleur (Applied Biosystems QuantStudio3 Real-Time PCR) est le suivant : 95°C pendant 10 min puis 40 cycles à 95°C pendant 15 sec et 60°C pendant 1 min. Le nombre de copies du génome viral a été calculé sur la courbe standard générée par qPCR des plasmides codant les VHH.

10. Histologie

10.1. Immunohistochimie

Les coupes flottantes sagittales sont rincées trois fois dans du PBS-0,2% Triton X100, les peroxydases endogènes sont désactivées avec une incubation d' H_2O_2 à 0,3% dans du PBS pendant 30 min. Après rinçage au PBS-Triton, le marquage non spécifique est éliminé avec du sérum normal de chèvre ou avec du réactif « Mouse On Mouse » (1/100, Vector Laboratories). Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire selon les conditions du tableau 4 dans du PBS-Triton sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes sont rincées puis incubées avec l'anticorps secondaire adapté dans du PBS-Triton une heure à température ambiante. Après trois rinçages, une amplification est réalisée par un complexe Streptavidine / Biotine-Péroxydase (ABC kit, 1/400, Vector Laboratories) pendant 2h. Après une série de rinçages, le signal est révélé par l'addition de diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) dans du Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,6 avec 0,15% d' H_2O_2 . Les coupes sont ensuite montées sur lame, séchées à l'air libre puis déshydratées dans des bains croissant d'éthanol de 5 min (30%, 70%, 95% puis 100%) suivis de trois bains de toluène de 5 min. Une lamelle est immédiatement posée avec du milieu de montage Vectamount (Vector laboratories).

Anticorps	Référence	Dilution	Espèce
Anticorps primaires			
AT8 biotinylé	Invitrogen MN1020B	1/500	-
AT100	Invitrogen MN1060	1/500	Souris
MC1	Peter Davies	1/500	Souris
Iba1	Wako, 019–19741	1/500	Lapin
Anticorps secondaires			
Anti-mouse IgG biotinylated	Vector Laboratories, BA-2001	1/400	Chèvre
Anti-rabbit IgG biotinylated	Vector Laboratories, BA-1000	1/400	Chèvre

Tableau 4: Anticorps utilisés pour les marquages immunohistochimiques et leurs conditions expérimentales

Pour la quantification à l’aveugle, les hippocampes correspondant aux bregmas médio-latéraux de 0,3 à 3,5 (selon l’atlas de souris de George Paxinos et Keith B.J. Franklin, Academic Press) sont dessinés sur 10 à 17 coupes sagittales par animal avec le logiciel de quantification Mercator (Explora Nova). Un seuillage constant est appliqué sur les régions. La surface détectée est rapportée à la surface de la région dessinée puis multipliée par 100 pour donner un pourcentage de surface marquée.

10.2. Immunohistofluorescence

Pour les coupes de cerveaux, les sections sont rincées trois fois au PBS-0,2% de Triton X100 puis le marquage non spécifique est éliminé avec du sérum normal de chèvre (1/100, Vector Laboratories). Les anticorps primaires sont appliqués selon les conditions décrites dans le tableau 5 dans du PBS-Triton sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes sont rincées puis incubées avec l’anticorps secondaire adapté dans du PBS-Triton une heure à température ambiante. Après trois rinçages, les coupes sont montées sur lame puis l’autofluorescence est atténuée par des bains de 5 min dans du PBS, de l’éthanol 70° puis d’une solution à base de Noir Soudan (Autofluorescence Eliminator, Millipore). Après rinçage 1 min dans l’éthanol 70°, les lamelles sont montées avec du milieu de montage supplémenté en DAPI (Vector Laboratories) pour la visualisation des noyaux.

Pour les coupes de moelle épinière, ces étapes sont précédées d’un déparaffinage et d’un démasquage antigénique par 8 min de tampon citrate (3,75 mM d’acide citrique, 2,5 mM de phosphate disodique, pH 6) à ébullition dans un autocuiseur.

Anticorps	Référence	Dilution	Espèce
Anticorps primaires			
GFP	Synaptic System, 132002	1/1000	Lapin
RFP	Rockland, 600–401-379	1/1000	Lapin
TGN46	Abcam, ab16059	1/200	Lapin
Calreticulin	Thermo, PA3-900	1/500	Souris
EEA1	Abcam, ab70521	1/100	Souris
Rab7	Abcam, ab50533	1/200	Souris
p62	Abcam, ab56416	1/200	Souris
LAMP2	Abcam, ab13524	1/200	Rat
LAMP2a	437005	1/200	Cobaye
AT8	Invitrogen, MN1020	1/500	Souris
Anticorps secondaires			
Anti-mouse IgG, Fcy fragment specific Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch, 115–545-008	1/500	Chèvre
Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11001	1/500	Chèvre
Anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647	Invitrogen, A21245	1/500	Chèvre
Anti-rat IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11006	1/500	Chèvre
Anti-Guinea pig IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen, A11073	1/1000	Chèvre

Tableau 5: Anticorps utilisés pour les marquages immunohistofluorescents et leurs conditions expérimentales

Les acquisitions d'images sont réalisées sur un scanner de lames à l'objectif 20X (Axioscan, Zeiss) ou sur un microscope confocal à l'objectif à immersion à huile 63X (LSM 710, Zeiss). Le traitement d'image est réalisé avec le logiciel Zen Blue (version 3.6, Zeiss).

La quantification du double marquage AT8-mCherry a été réalisé par un script développé dans le logiciel ImageJ afin d'extraire l'hippocampe et de quantifier la zone présentant un double marquage avec un filtre de particules de 50 à 200 000 pixels, un seuillage du marquage vert (AT8) de 5000 à 65535 et du marquage rouge (mCherry endogène) de 7200 à 65535.

11. Tests Biochimiques

11.1. Lysats hippocampiques

Les hippocampes ont été lysés par sonication dans 200 µL de solution Tris base 10 mM pH 7,4 contenant 10% de sucrose. Les concentrations en protéines ont été déterminées par un test colorimétrique à l'acide bicinchonique (BCA assay, Pierce). Les échantillons sont dilués avec du dodécylsulfate de lithium (LDS, Invitrogen) et de l'agent réducteur dithiothréitol (DTT, Invitrogen) puis

chauffés 10 min à 100°C. Ensuite, 10 µg de protéines sont séparés selon leur masse moléculaire par électrophorèse monodimensionnelle sur un gel d'acrylamide 4-12% Bis-Tris (Nupage, invitrogen) avec un voltage constant de 200 volts pendant une heure. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm (Amersham) grâce à une voltage de 30 volts pendant 90 minutes. Une coloration au Rouge Ponceau (0,2% Ponceau 2R, 3% d'acide trichloroacétique) est réalisée pour contrôler la qualité du transfert. Les membranes sont ensuite lavées dans du tampon TNT (Tris 15 mM pH8, NaCl 140 mM, 0,05% Tween), saturées avec 5% de lait ou 5% de BSA dans du TNT puis incubées avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation sur la nuit à 4°C (voir tableau 6). Le lendemain, après trois lavages au TNT, l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase anti-souris au 1/50 000 ou anti-lapin au 1/5000 (Vector laboratories) est appliqué sur les membranes 45 min à température ambiante. Après trois lavages, la peroxydase est révélée par chemiluminescence (ECL, Amersham). Le signal est visualisé par un système LAS4000 (GE Healthcare). Les bandes obtenues sont quantifiées par le logiciel ImageQuant (GE Healthcare). Une normalisation du signal est effectuée sur le signal des protéines GAPDH ou actine, servant de contrôle de charge.

Anticorps	Référence	Dilution	Espèce
Anticorps primaires			
Tau C-ter	Home-made, 993-S1	1/4000	Lapin
NeuN	Abcam, ab177487	1/5000	Lapin
GFAP	Sigma-Aldrich, G3893	1/1000	Souris
Iba1	Abcam, ab178846	1/1000	Lapin
pEIF2α	Thermofischer, MA5-15133	1/1000	Lapin
EIF2α	Cell Signaling, 5324	1/1000	Lapin
ATF4	Cell Signaling, 11815	1/1000	Lapin
pErk	Cell Signaling, 9106	1/2000	Souris
Erk	Cell Signaling, 9102	1/1000	Lapin
Snap25	SantaCruz, sc-376713	1/1000	Souris
PSD95	Cell Signaling, 2507	1/1000	Lapin
LC3b	Cell Signaling, 2775	1/2000	Lapin
MBP	Sigma Aldrich AB15542	1/5000	Lapin
CPNPase	Abcam, ab6319	1/1000	Souris
GAPDH	Sigma Aldrich, G9545	1/50000	Lapin
Actin	Sigma Aldrich, A5441	1/25000	Souris
AT100	Invitrogen MN1060	1/500	Souris
Anticorps secondaires			
Anti-Souris IgG Fc HRP	Invitrogen31439	1/20000	Chèvre
Anti-Lapin IgG (H+L) peroxidase	Vector Laboratories, PI-1000	1/5000	Chèvre
Anti-Souris IgG (H+L) peroxidase	Vector Laboratories, PI-2000	1/50000	Cheval

Tableau 6: Anticorps utilisés pour les tests biochimiques et leurs conditions expérimentales

11.2. Séparation des fractions soluble et insoluble

Une séparation des fractions solubles et insolubles de la protéine tau a été réalisée à partir de 200 µg de lysat hippocampique dans 800 µL de solution Tris base 10 mM pH 7,4 contenant 10% de sucrose et 0,2 % de TritonX100. Après sonication (20 impulsions de 0,5 à amplitude 40), une étape de centrifugation est réalisée pour éliminer les débris tissulaires (5000g, 10min, 4°C). Une ultracentrifugation du surnageant est ensuite réalisée (100 000 g ; 1h ; 4°C). Le surnageant est considéré comme la fraction soluble et le culot est repris dans 800 µL de tampon Sarkosyl (Tris/HCl 10mM, pH=7,4 ; sucrose 0,32M ; 1% Sarkosyl) et repassé en ultracentrifugation (100000 g ; 1h ; 4°C) après sonication (20 impulsions de 0,5 à amplitude 40). Le culot contient les espèces insolubles de protéine tau (oligomères insolubles et agrégats). Les différentes fractions sont reprises dans une solution de LDS 2X et sont analysées en électrophorèse monodimensionnelle.

12. Analyse du plasma

Lors du sacrifice, le sang est prélevé par ponction cardiaque avec un tube capillaire recouvert d'EDTA (Microvette EDTA K2E, Sarstedt) et centrifugé à 200g pendant dix min à 4°C. Le plasma est récolté et stocké à -80°C. Les plasmas des souris sont centrifugés une nouvelle fois 5 min à 10 000g à 4°C, dilués huit fois dans le tampon du kit et utilisés en duplicate pour le dosage de protéines en utilisant le kit Simoa selon les instructions du fabricant. L'incubation avec des billes paramagnétiques couvertes de l'anticorps de capture et d'un anticorps de détection marqué par l'enzyme streptavidine β -galactosidase permet de former un immunocomplexe. Celui-ci est remis en suspension dans une solution contenant le substrat de l'enzyme, le résorufin- β -D-galactopyranoside, puis transféré sur des disques contenant plus de 200 000 puits de 50 femtolitres répartis sur des réseaux permettant la séparation des billes une à une. L'appareil SR-X (Quanterix) permet la lecture de la fluorescence à 585 nm. Un kit de dosage Simoa Neuro 4-Plex B (Quanterix) a permis le dosage de plusieurs protéines : le NfL, la protéine tau, GFAP et UCH-L1. Les contrôles internes fournis par le fabricant étaient bien dans la plage spécifiée et tous les échantillons étaient au-dessus de la limite la plus basse de quantification (LLOQ) pour chaque mesure (LLOQ=0.5 pg/mL pour Tau, 2 pg/mL pour NfL, 9.38 pg/mL pour GFAP et 37,5 pg/mL pour UCHL1).

13. Analyses statistiques

La normalité de la distribution des échantillons a été vérifiée par un test de Shapiro-Wilk. Les groupes ont été comparés avec une valeur hypothétique grâce à un test t sur un échantillon pour une distribution paramétrique ou un test de Wilcoxon pour une distribution non normale. Les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées avec un test t de Student non apparié en cas de distribution normale ou avec un test de Mann & Whitney pour une distribution non paramétrique. Les comparaisons entre plusieurs groupes ont été réalisées avec un test One-way ANOVA pour les populations normales et avec un test de Kruskal-Wallis pour les populations non paramétriques. Les analyses statistiques sur plusieurs paramètres ont été réalisées avec un test Two-way ANOVA avec une correction de Geisser-Greenhouse. Pour l'analyse des tests comportementaux, les valeurs s'écartant de la moyenne de plus de 2 écarts-types ont été retirées. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism. Les comparaisons présentant une valeur de p inférieure à 0,05 ont été considérées comme ayant une différence significative.

RESULTATS

A. Développement des outils de modélisation

Les VHHs ont la propriété de pouvoir être exprimés et de reconnaître leur cible dans l'environnement intracellulaire. Le VHH intraZ70 est issu du VHH E4-1, reconnaissant l'épitope PHF6, qui a été optimisé par mutagenèse pour une expression et une solubilité intracellulaires optimales (Danis et al., 2022). Pour un adressage extracellulaire, l'extraZ70 a été construit avec une séquence de sécrétion IL2ss. Il est également fusionné en C-ter avec un fragment Fc afin d'augmenter sa demi-vie dans le milieu extracellulaire et d'amorcer une prise en charge par la microglie à l'instar des anticorps conventionnels.

1. Adressage intra et extracellulaire des VHHs

Dans un premier temps, nous avons validé *in vitro* la qualité de l'adressage intra ou extracellulaire de nos constructions. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec un plasmide codant pour l'intraZ70, l'intraCtrl, l'extraZ70 ou l'extraCtrl. 48h post-transfection, l'homogénat de cellules et le milieu de culture ont été collectés et la présence des VHHs détectés par électrophorèse monodimensionnelle grâce à un anticorps dirigés contre les VHHs. Le poids moléculaire des VHHs étant de 14 kDa et celui de la mCherry 26 kDa, les intra Z70 et intraCtrl sont détectés dans le lysat cellulaire à la taille prévue de 40 kDa et ne sont pas visualisés dans le milieu de culture. Alors que les extra Z70 et extraCtrl sont retrouvés à la fois dans le lysat et dans le milieu de culture à la taille de 42 kDa, le fragment Fc ayant un poids moléculaire de 25 kDa et le VHH additionné de la séquence IL2ss de 17 kDa (Figure 23b). Pour ces derniers, leur présence a été validée à la même taille avec un anticorps dirigés contre le fragment Fc de souris (Figure 23c). Pour mieux comprendre la configuration des extraVHHs, une électrophorèse monodimensionnelle des mêmes échantillons avec et sans agent réducteur a été réalisée. Avec les anticorps anti-VHH (Figure 23d) et anti-Fc (Figure 23e), le poids moléculaire des extraVHHs passe à 80 kDa en conditions non dénaturantes, suggérant leur dimérisation.

Ces résultats confirment l'efficacité de la séquence de sécrétion contenue dans les extraVHH et l'adressage correcte de nos constructions.

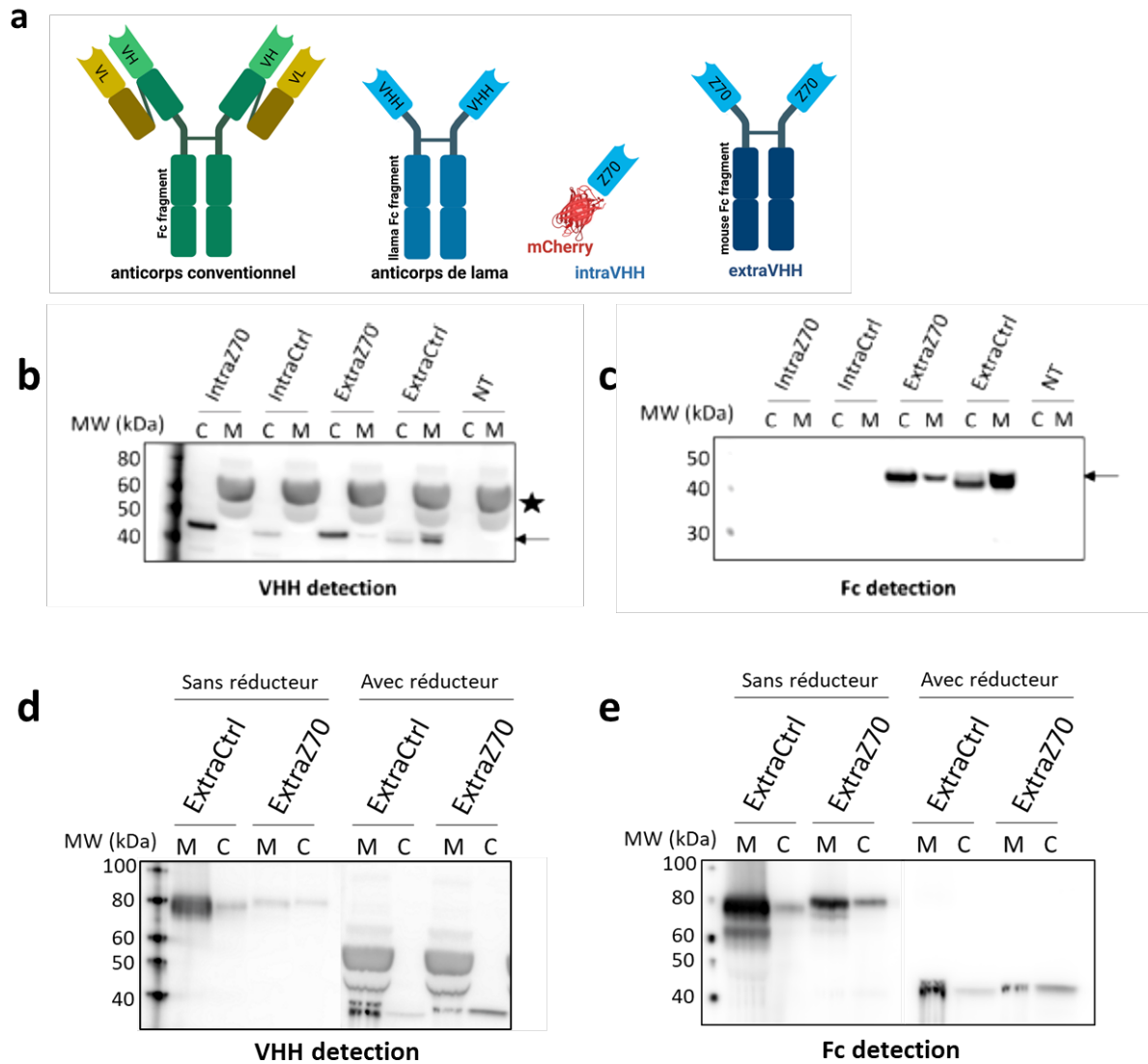


Figure 23: Les différentes constructions utilisées et leur localisation cellulaire

(a) Représentation schématique de gauche à droite : Anticorps conventionnel présentant un fragment constant (Fc), 2 domaines variables (VL) et 2 domaines lourds (VH). Anticorps de lama contenant uniquement des domaines lourds. Le VHH Z70 est un domaine variable d'un anticorps de camélidés ; pour notre étude, l'intraZ70 est fusionné à la protéine rapportrice mCherry. Le VHH Z70 associé à un fragment Fc de souris est l'extraZ70. Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les plasmides exprimant l'intraZ70, l'intraCtrl, l'extra Z70 et l'extraCtrl ou sans plasmide (NT). L'expression des VHHs est détectée par western-blot à partir de lysat cellulaire (C) ou du milieu (M) grâce à un anticorps anti-VHH. **(b)** ou l'anticorps anti-Fc de souris **(c)**. L'étoile indique la présence de contaminant du milieu de culture. La flèche indique la taille attendue des VHHs. Une électrophorèse monodimensionnelle a été réalisée sur les mêmes échantillons avec et sans agent réducteur. Les extraVHHs sont visualisés avec un anticorps anti-VHH **(d)** ou un anticorps anti-Fc de souris **(e)**.

2. Sélection du vecteur viral pour une modélisation chez la souris

Afin de tester l'efficacité et l'innocuité de nos VHHs, le choix s'est tourné vers un vecteur viral AAV. Les AAVs sont des virus non-pathogéniques chez l'humain. Ils sont non-réplicatifs car leur réplication naturelle dépend d'une co-infection avec d'autres virus, comme l'adénovirus. La cytotoxicité des AAV est plus faible que celle des vecteurs adénoviraux ou lentiviraux. Les vecteurs viraux AAV ont également l'avantage de ne pas s'intégrer aléatoirement dans le génome de l'hôte contrairement aux vecteurs issus des lentivirus ou des rétrovirus (Ginn et al., 2010). Le génome de l'AAV persiste très majoritairement en tant qu'épisome extra-chromosomique, qui a démontré une expression du transgène efficace et stable dans le temps (Muhuri et al., 2022). Leur capacité à effectuer du transport antérograde et rétrograde permet une meilleure diffusion du vecteur dans un tissu. De plus, grâce à une grande variété de capsides, le pseudotypage des AAVs permet de cibler différents tissus. Dans un cadre thérapeutique, nous souhaitons une expression dans une majeure partie du SNC. Pour ce faire, le génome de l'AAV2 a été combiné avec des capsides de plusieurs sérotypes d'AAV décrits comme ayant un tropisme pour le système nerveux central : AAV7, AAV8, AAV9 et AAV10 (Issa et al., 2023; J.-H. Wang et al., 2024). Ces quatre sérotypes exprimant la protéine GFP sous le contrôle d'un promoteur ubiquiste, le promoteur du cytomégalo virus (CMV), ont été injectés dans l'hippocampe ou dans les ventricules cérébraux de souris Tg30. Un mois post-injection, la présence de la GFP dans le SNC a été détectée par immunomarquage et quantifiée. On remarque une absence d'expression suite à une injection intracérébroventriculaire quel que soient les vecteurs utilisés (Figure 24a). Suite à une injection dans l'hippocampe, plus précisément dans la première aile de la corne d'Ammon (CA1), le vecteur pseudotypé AAV2/8 est beaucoup moins efficace que les vecteurs pseudotypés AAV2/7, AAV2/9 et AAV2/10 (Figure 24b). Pour discriminer ces trois derniers, la sélection se base sur l'expression dans la moelle épinière ; cette région étant atteinte de pathologie tau dans le modèle de souris Tg30 (Schindowski et al., 2006). Un immunomarquage de la GFP a été réalisé dans la moelle épinière des souris et l'AAV2/9 présente la meilleure expression (Figure 24c). Pour compléter cette caractérisation, la distribution de l'AAV2/9 au sein de la moelle épinière a été comparée à la distribution de la pathologie dans les souris Tg30 âgées de 10 mois. La présence de GFP est retrouvée dans les fractions cervicale, thoracique et dorsale de la moelle épinière des souris injectées dans l'hippocampe avec l'AAV2/9 exprimant la GFP (Figure 24d haut). La protéine tau hyperphosphorylée est retrouvée dans les mêmes zones de la moelle épinière chez les souris Tg30 (Figure 24d bas). Le vecteur pseudotypé AAV2/9 est donc sélectionné pour une modélisation chronique chez la souris.

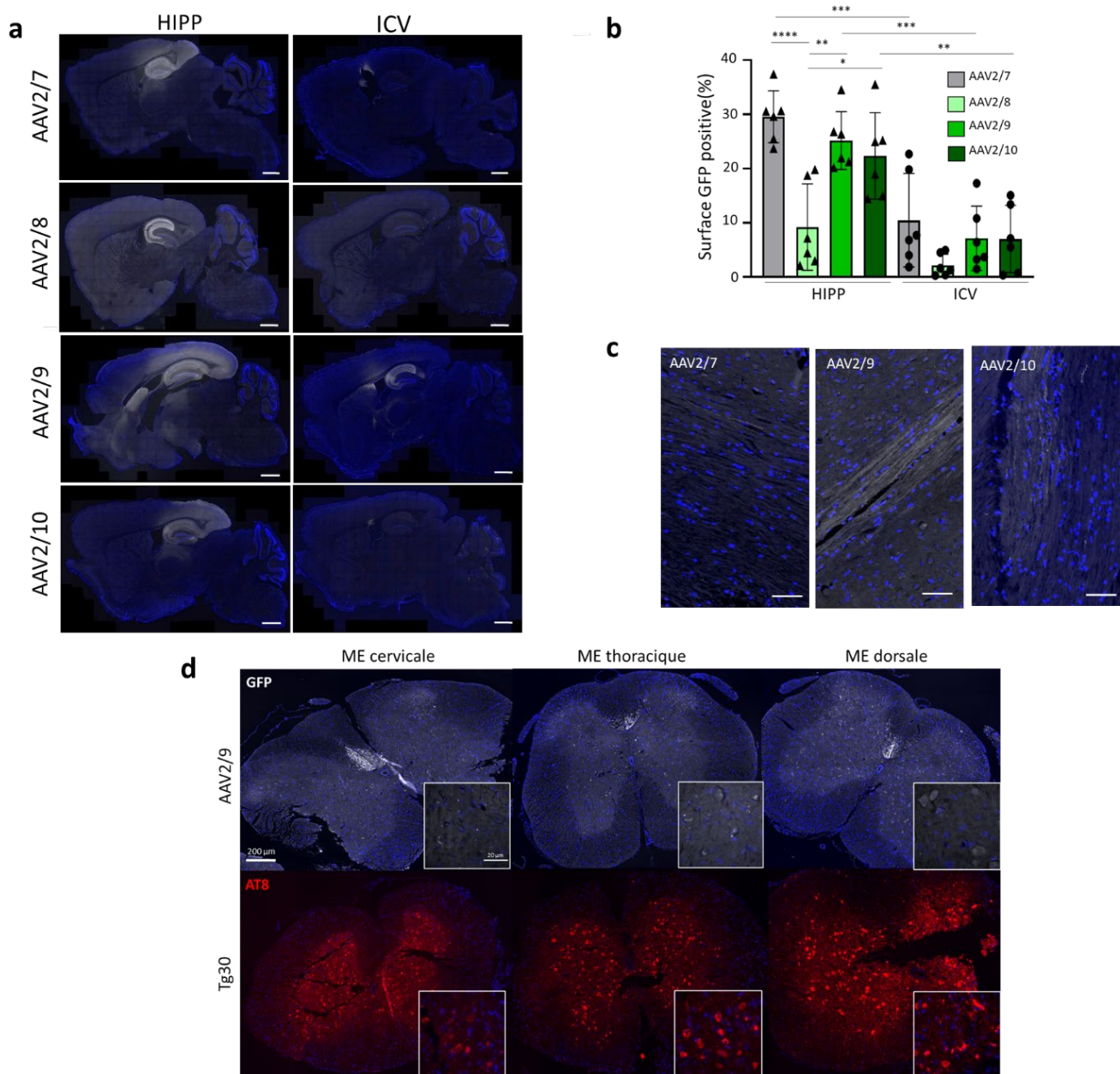


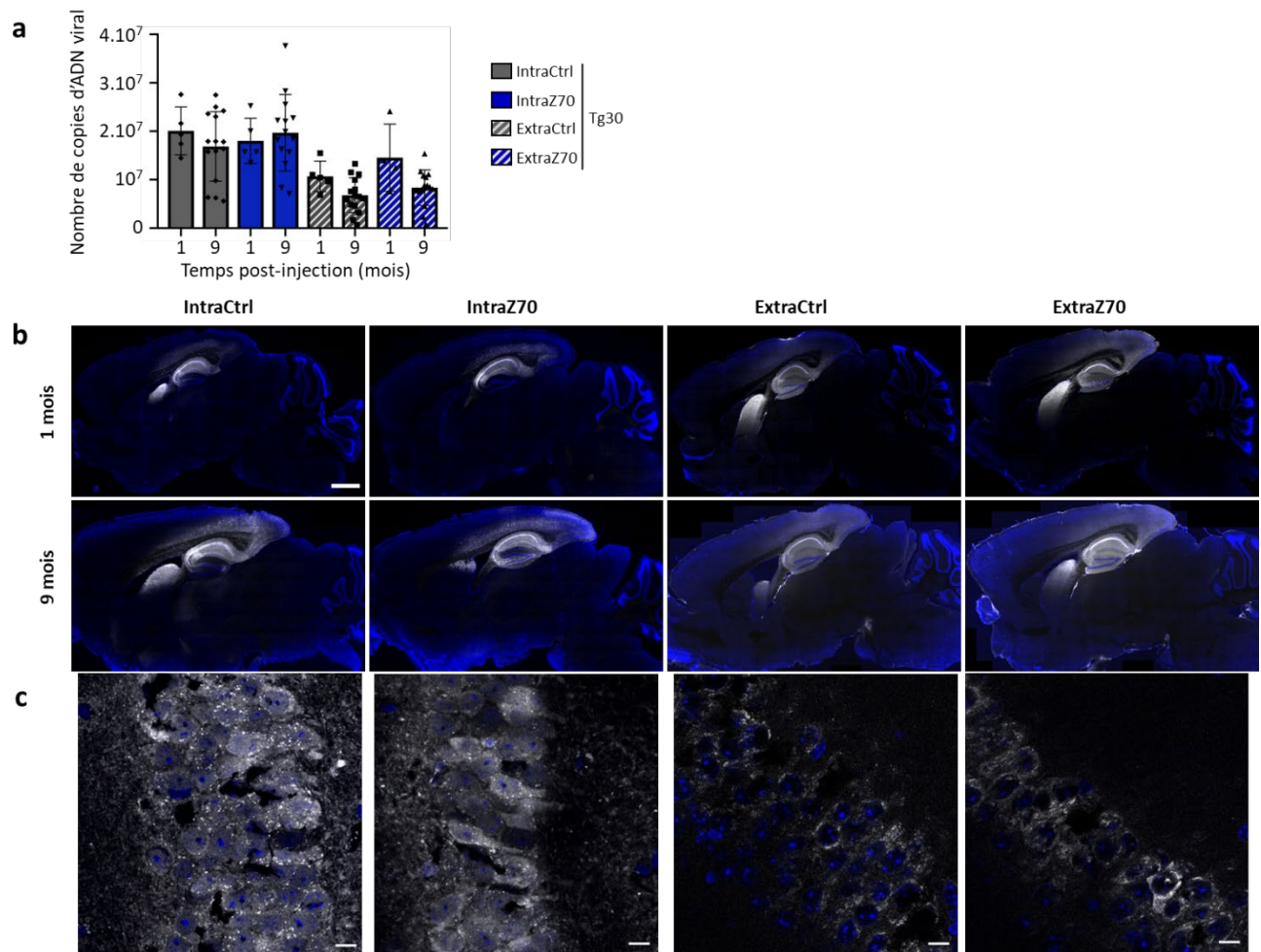
Figure 24: Distribution de l'expression et sélection des AAVs

(a) Immunodétection de la GFP en blanc et des noyaux en bleu un mois après injection dans l'hippocampe (HIPP) ou dans les ventricules cérébraux (ICV) sur coupes sagittales. H= hippocampe, ViC= cortex visuel. Echelle= 1000 μ m. **(b)** Quantification de l'expression de la GFP avec Image J. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$. **(c)** Immunodétection de la GFP en blanc et des noyaux en bleu dans la moelle épinière. Echelle= 50 μ m. **(d)** Immunodétection de la GFP en blanc sur coupe de moelle épinière de souris injectées dans l'hippocampe avec l'AAV2/9 (panel du haut) ou de la protéine tau hyperphosphorylée par l'anticorps AT8 en rouge dans des souris Tg30 de 10 mois (panels du bas).

3. Expression des VHHs après injection intra-hippocampique chez la souris

Pour étudier les effets de l'expression des VHHs à long terme, nous avons vérifié la stabilité de l'épisme des vecteurs viraux exprimant nos constructions. Pour ce faire les AAV2/9 intraCtrl, intraZ70, extraCtrl ou extraZ70 ont été injectés dans l'hippocampe de souris Tg30. Un ou neuf mois après l'injection, l'hippocampe a été disséqué. Quelle que soit la construction de VHH utilisée, l'analyse du génome ne montre aucune différence significative de quantité d'ADN viral entre un et neuf mois, confirmant la stabilité de l'épisme des AAV. Également, l'intraZ70 et l'extraZ70 ont un niveau d'expression identique à leur contrôle respectif (Figure 25a).

Dans un second temps, l'expression des VHHs a été détectée par immunomarquage sur des coupes de cerveau des souris. Les VHHs sont présents un et neuf mois après l'injection à un niveau d'expression comparable (Figure 25b), leur localisation est principalement dans l'hippocampe et dans le cortex visuel.



(Figure de la page précédente)

Figure 25: Stabilité de l'expression des VHHs par vecteur viral

Les vecteurs AAVs exprimant les VHHs ont été injectés dans l'hippocampe de souris Tg30 et les animaux ont été sacrifiés 1 ou 9 mois post-injection. **(a)** Détection de l'épisome viral par qPCR du lysat d'hippocampe 1 ou 9 mois post-injection. Immunodétection des VHHs sur coupe sagittale de cerveau à l'aide d'un anticorps anti-RFP pour les intraCtrl et intraZ70 ou d'un anticorps anti-Fc pour les extraCtrl et extraZ70. **(b)** Acquisitions issues du scanner de lames. Echelle = 1000µm. **(c)** Acquisitions issues de microscopie confocale. Echelle = 10µm.

Pour mieux visualiser la localisation des VHHs suite à leur expression *in vivo*, un immunomarquage fluorescent par l'anticorps anti-VHH a été observé en plan focal. L'intraZ70 est bien retrouvé à l'intérieur des cellules suite à une expression *in vivo* à long terme, cependant une partie du marquage est d'aspect ponctiforme (Figure 25c). Certains nanocorps ont une mauvaise solubilité et ont tendance à s'auto-agréger, formant des agrégats punctiformes (Danis et al., 2022; Mortelet et al., 2024). La macroautophagie est la voie de dégradation cellulaire référente pour les agrégats insolubles dans laquelle intervient la protéine p62 (Kumar et al., 2022). Un co-marquage fluorescence de l'intraZ70 avec la protéine p62 a été réalisé sur les coupes de cerveaux de souris injectées avec l'intraZ70 et ne montre pas de co-localisation (Figure 26a). L'autophagie n'étant pas impliquée dans la prise en charge de ces puncta, des marqueurs d'autres voies de dégradation cellulaire ont été visualisés. Nous n'observons pas de colocalisation entre l'intraZ70 et les endosomes précoces ou tardifs, visualisés par l'anticorps anti-EEA1 et anti-Rab7 respectivement (Trofimenko et al., 2021) (Figure 26 b et c). Par contre, un co-marquage entre l'intraZ70 et LAMP2 est retrouvé dans les lysosomes (Figure 26d). Cependant, l'utilisation d'un anticorps spécifique de l'isoforme LAMP2A, spécifique de l'autophagie médiée par les chaperonnes, n'a pas permis de valider l'implication de cette voie de dégradation (Figure 26e). La protéine LAMP2c étant spécialisée dans la dégradation des acides nucléiques, l'implication de LAMP2b est l'hypothèse la plus probable. Celle-ci est nécessaire dans la fusion des lysosomes et des autophagosomes et est un composant des membranes des exosomes (Qiao et al., 2023). Malheureusement, aucun anticorps dirigé contre LAMP2b compatible avec nos contraintes techniques n'est disponible à ce jour.

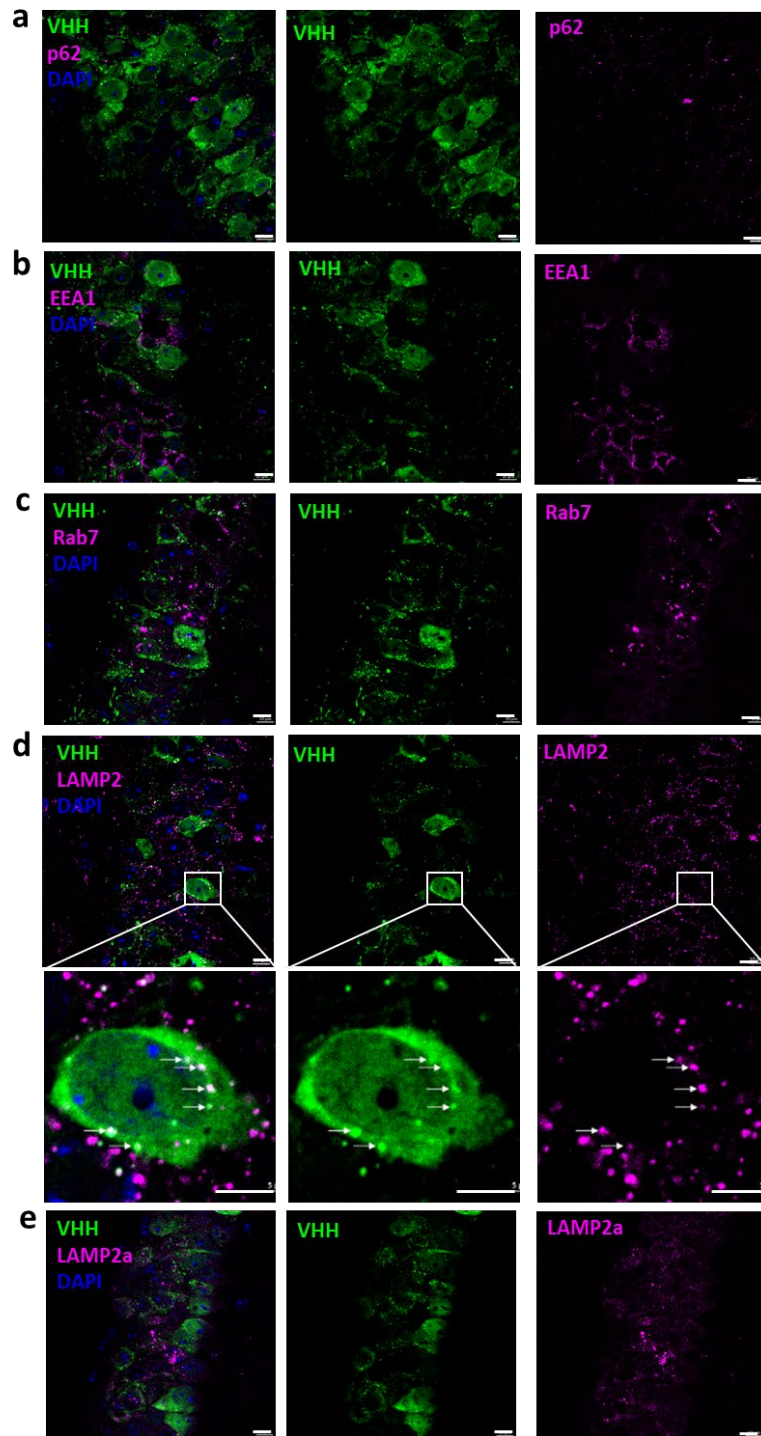


Figure 26: Co-localisation de l'intraZ70 avec des marqueurs des différentes voies de dégradation intracellulaire

9 mois après l'injection dans l'hippocampe de l'AAV2/9 exprimant l'intraZ70, les animaux sont sacrifiés et des analyses d'immunofluorescence sont réalisées sur coupes de cerveau. Echelle = 10 μ m. En bleu, sont visualisés les noyaux avec un marquage au DAPI, en vert le VHH Z70 avec un anticorps anti-RFP. **(a)** p62, **(b)** EEA1, **(c)** Rab7, **(d)** LAMP2 et un agrandissement numérique de la zone encadrée (Echelle = 5 μ m), **(e)** LAMP2a sont représentés en violet.

L'adressage des extraZ70 a également été caractérisé par des co-marquages avec des voies de sécrétion. La protéine TGN46 est impliquée dans le réseau trans-golgien de sécrétion (Lujan et al., 2024) mais elle n'est pas retrouvée associée à l'extraZ70 (Figure 27a). Par contre, l'extraZ70 est associée avec la calréticuline, une protéine du réticulum endoplasmique (Michalak, 2023) (Figure 27b). Ces résultats confirment l'implication d'une voie de sécrétion pour l'adressage extracellulaire des extraVHHs.

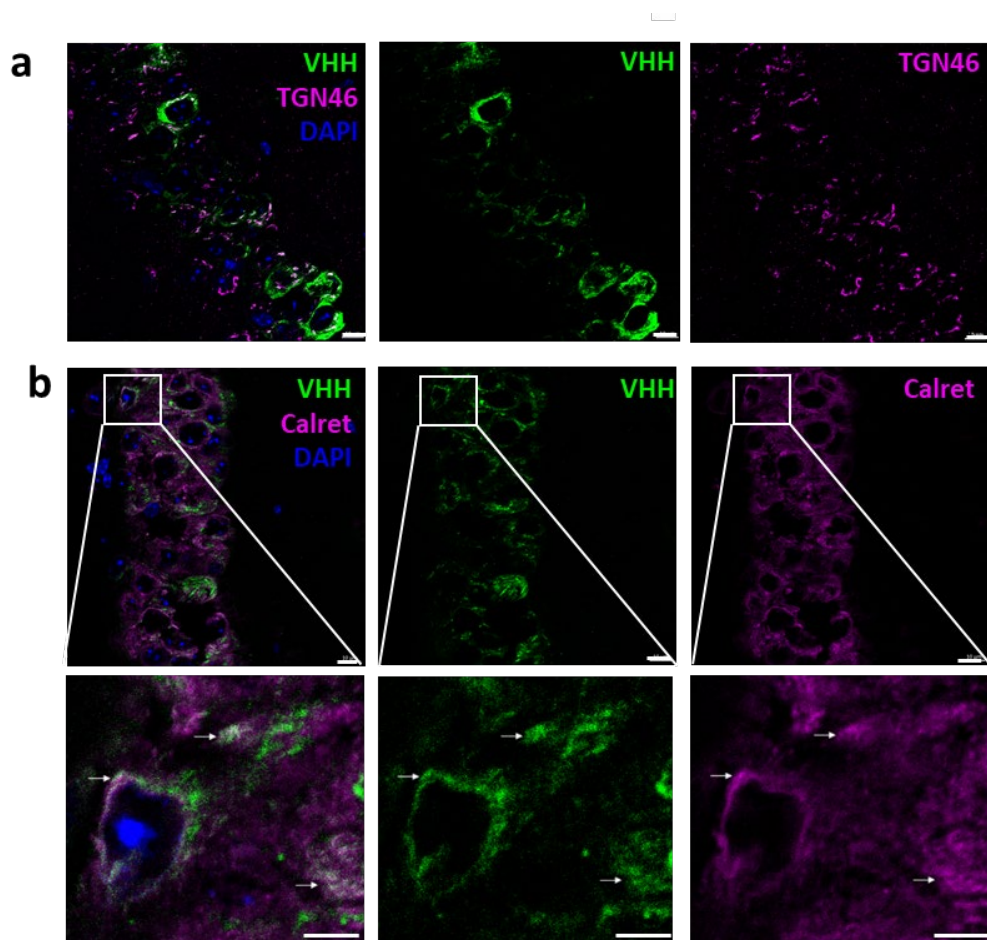


Figure 27: Localisation de l'extraZ70 dans les différentes voies de sécrétion

9 mois après l'injection dans l'hippocampe de l'AAV2/9 exprimant l'extraZ70, les animaux ont été sacrifiés et des analyses par immunofluorescence ont été réalisées sur des coupes de cerveau. Echelle = 10 μ m. En bleu, sont visualisés les noyaux avec un marquage au DAPI, en vert le VHH Z70 avec un anticorps anti-Fc. En violet sont représentés les immunomarquages de (a) TGN46 et (b) Calréticuline avec un agrandissement numérique de la zone encadrée (Echelle = 5 μ m).

Pour conclure, ces premières analyses permettent de valider :

- L'adressage correct de nos constructions,
- L'utilisation du vecteur viral AAV2/9 en injection intra-hippocampique,
- L'expression à long terme de nos constructions *in vivo*.

Cette validation nous permet de pouvoir étudier les effets du Z70 exprimé à l'intérieur des cellules ou dans le milieu extracellulaire.

B. Etude de l'innocuité du Z70 ciblant la protéine tau intra ou extracellulaire

Le Z70 ciblant l'épitope PHF6, il est possible qu'il interagisse avec la protéine tau physiologique et perturbe ses fonctions. Bien que les souris KO-Tau aient un développement normal, certaines altérations ont été reportées dans ce modèle. Ces animaux présentent une prise de poids supérieure aux souris sauvages (Marciniak et al., 2017). Ils présentent des modifications de motricité et de positionnement des pattes postérieures (Lei et al., 2014; Q.-L. Ma et al., 2014), une anxiété et une mémoire altérées (Gonçalves et al., 2020; Q.-L. Ma et al., 2014) ainsi qu'une perte synaptique (Q.-L. Ma et al., 2014).

Une évaluation à long-terme des effets indésirables potentiels des VHH Z70 ciblant la protéine tau intra ou extracellulaire dans la souris WT nous permet d'évaluer différents paramètres centraux ou périphériques comme la prise de poids, l'imagerie cérébrale, le comportement ainsi que des marqueurs cérébraux ou sanguins. Les AAV2/9 exprimant les VHHs intra et extraZ70 sont comparés au vecteur AAV2/9 vide. Le vecteur exprimant la protéine GFP est également injecté pour un contrôle de surexpression de protéine.

1. Prise de poids des animaux

Des vecteurs AAV2/9 exprimant l'intraZ70, l'extraZ70 ou la protéine GFP comme contrôle ont été injectés dans l'hippocampe de souris WT âgées de 1 mois. Un contrôle AAV2/9 n'exprimant aucune protéine a également été injecté. Les animaux ont été suivis jusqu'à l'âge de 10 mois. Aucune différence de prise de poids n'a été observée entre les groupes, suggérant l'absence de trouble majeur du métabolisme des souris WT exprimant les VHHs Z70 (Figure 28).

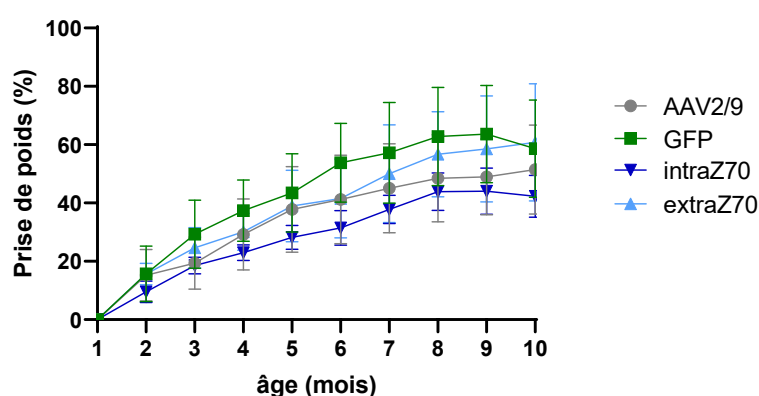
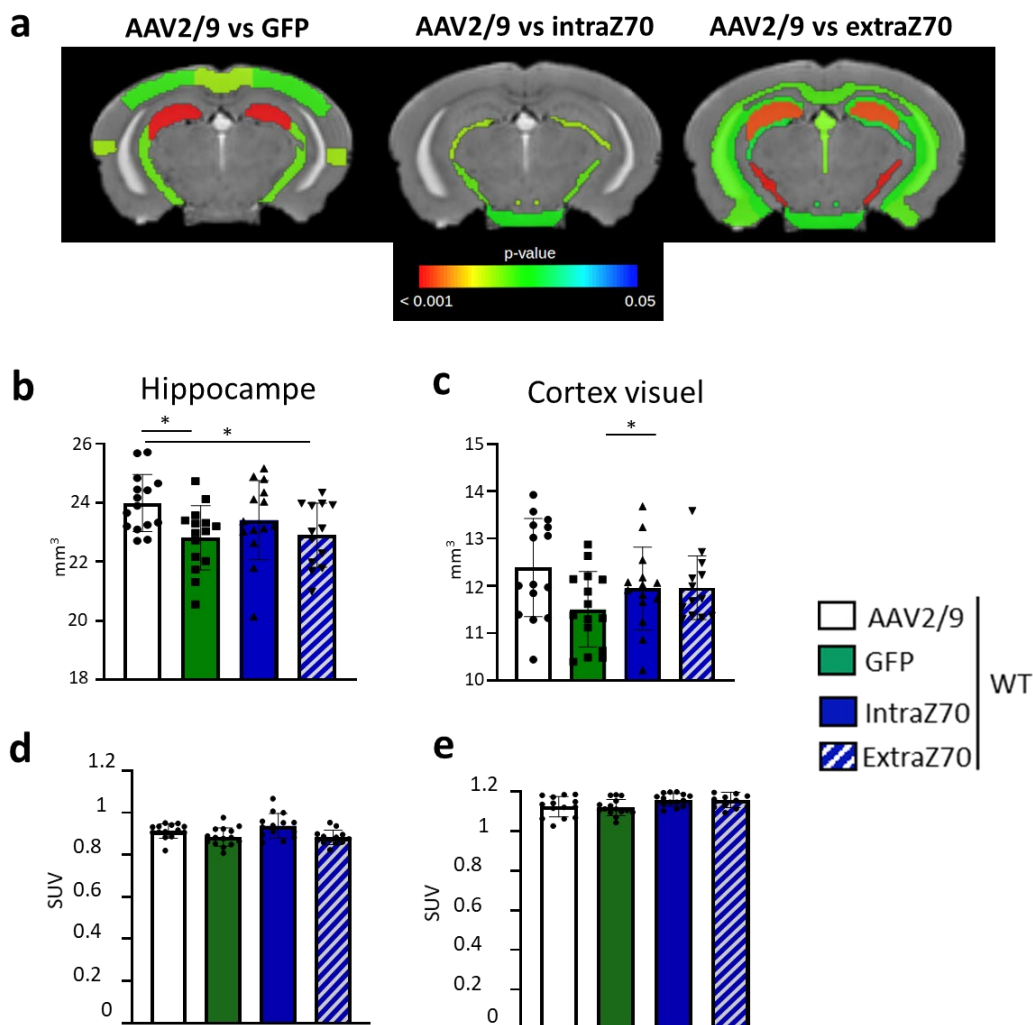


Figure 28: Prise de poids de souris WT après injection avec l'intra ou l'extraZ70

Les souris ayant reçu une injection intra-hippocampique d'AAV2/9 vide ou codant pour la GFP, l'intraZ70 ou l'extraZ70 sont pesées tous les mois. La prise de poids est exprimée en pourcentage par rapport au poids de départ.

2. Imagerie cérébrale

Huit mois après l'injection des AAVs dans l'hippocampe, le cerveau des souris est analysé par de l'imagerie cérébrale IRM et TEP. Dans un premier temps, le volume des régions avec la plus grande expression de transgène, soit l'hippocampe et le cortex visuel (Figure 25b), a été mesuré sur les acquisitions d'IRM. Une atrophie de ces régions pour les souris ayant reçu le vecteur exprimant la GFP est observée. Les souris du groupe intraZ70 ont un volume hippocampique et cortical identique aux souris AAV2/9 vide. Les souris extraZ70 ont une réduction significative du volume de l'hippocampe mais un volume du cortex identique aux souris contrôles (Figure 29 b et c). L'imagerie PET du ^{18}F FDG a permis de visualiser la prise du glucose dans le cerveau des animaux. Aucune différence de la consommation n'a été observé entre les groupes GFP, intraZ70 et extraZ70 comparés à l'AAV2/9 dans l'hippocampe ainsi que dans le cortex visuel (Figure 29 d et e), suggérant une intégrité générale des neurones et l'absence d'inflammation majeure.



(Figure de la page précédente)

Figure 29: Imagerie cérébrale des souris WT

8 mois après injection, le volume cérébral est mesuré par IRM. **(a)** Différence statistique entre les souris du groupe VLP et celles des groupe GFP, intraZ70 ou extraZ70. L'échelle colorimétrique établie par la logiciel NUS indique les valeurs de p , allant du bleu ($p=0,05$) au rouge ($p<0,005$) **(b)** Volume de l'hippocampe en mm^3 . **(c)** Volume du cortex visuel en mm^3 . Consommation du glucose mesurée par FDG-TEP dans l'hippocampe **(d)** ou dans le cortex visuel **(e)** * : $p<0,05$.

Dans un second temps, l'analyse des tenseurs de diffusion par séquence DTI en imagerie IRM nous permet d'étudier la microstructure et l'organisation des tissus, notamment l'intégrité de la substance blanche. Cette technique analyse la diffusion des molécules d'eau dans les trois dimensions. Dans des fibres saines, les molécules d'eau se déplacent dans une direction privilégiée le long de l'axone et ont donc une diffusion anisotrope (Figure 30). Les valeurs de diffusion dans les trois dimensions permettent d'obtenir les paramètres de diffusivité moyenne (MOY), longitudinale (LONG), radiale (RAD) et la fraction d'anisotropie (FA).

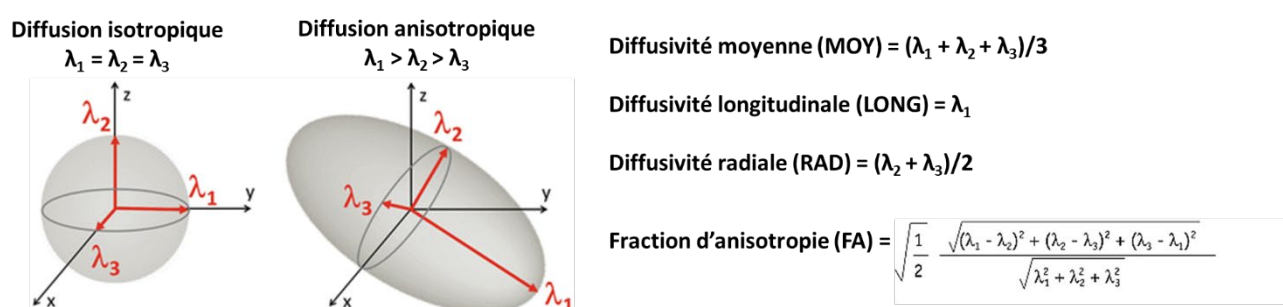


Figure 30: Représentation des tenseurs de diffusion

Les valeurs des tenseurs de diffusion sont représentées en trois dimensions (λ_1 , λ_2 , λ_3). Lorsque la diffusion n'a pas de direction préférentielle, elle peut être représentée par une sphère. Lorsque la diffusion est anisotrope, elle est ellipsoïdale et orientée sur l'axe principal le plus long (λ_1). Les vecteurs λ_2 et λ_3 sont perpendiculaires à l'axe principal. Plusieurs paramètres peuvent être calculés à partir la valeur de ces trois vecteurs : les diffusivités moyenne, longitudinale ou radiale et la fraction d'anisotropie. Adapté de (Lope-Piedrafita, 2018)

Dans l'hippocampe et le cortex visuel, il n'y a pas de différence de FA entre le groupe AAV2/9 et les autres groupes (Figure 31 a et e). Cependant lorsque les autres composantes de l'anisotropie sont analysées, une hausse des diffusivités moyenne (Figure 31 b et f), longitudinale (Figure 31 c et g) et radiale (Figure 31 d et h) est observée chez les souris injectées avec l'intraZ70 et l'extraZ70 pour les deux régions d'intérêt. Cette différence dans les trois dimensions explique l'absence de variation de la FA. Ces modifications pouvant refléter des altérations de la myéline (Aung et al., 2013; Figley et al.,

2022), une quantification des protéines MBP (Myelin Basic Protein) et CNPase (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase), deux marqueurs de la myéline, a été réalisée par électrophorèse monodimensionnelle à partir d'extrait de lysat d'hippocampe (Figure 31i). Dans les hippocampes du groupe GFP, une augmentation de MBP est observée par rapport au groupe AAV2/9. Dans les groupes intraZ70 ou extraZ70, il n'y a aucune différence de quantité de MBP (Figure 31j) ou de CNPase (Figure 31k) par rapport aux souris du groupe VLP. Les résultats de DTI observés ne semblent donc pas être la conséquence d'une démyélinisation importante des axones.

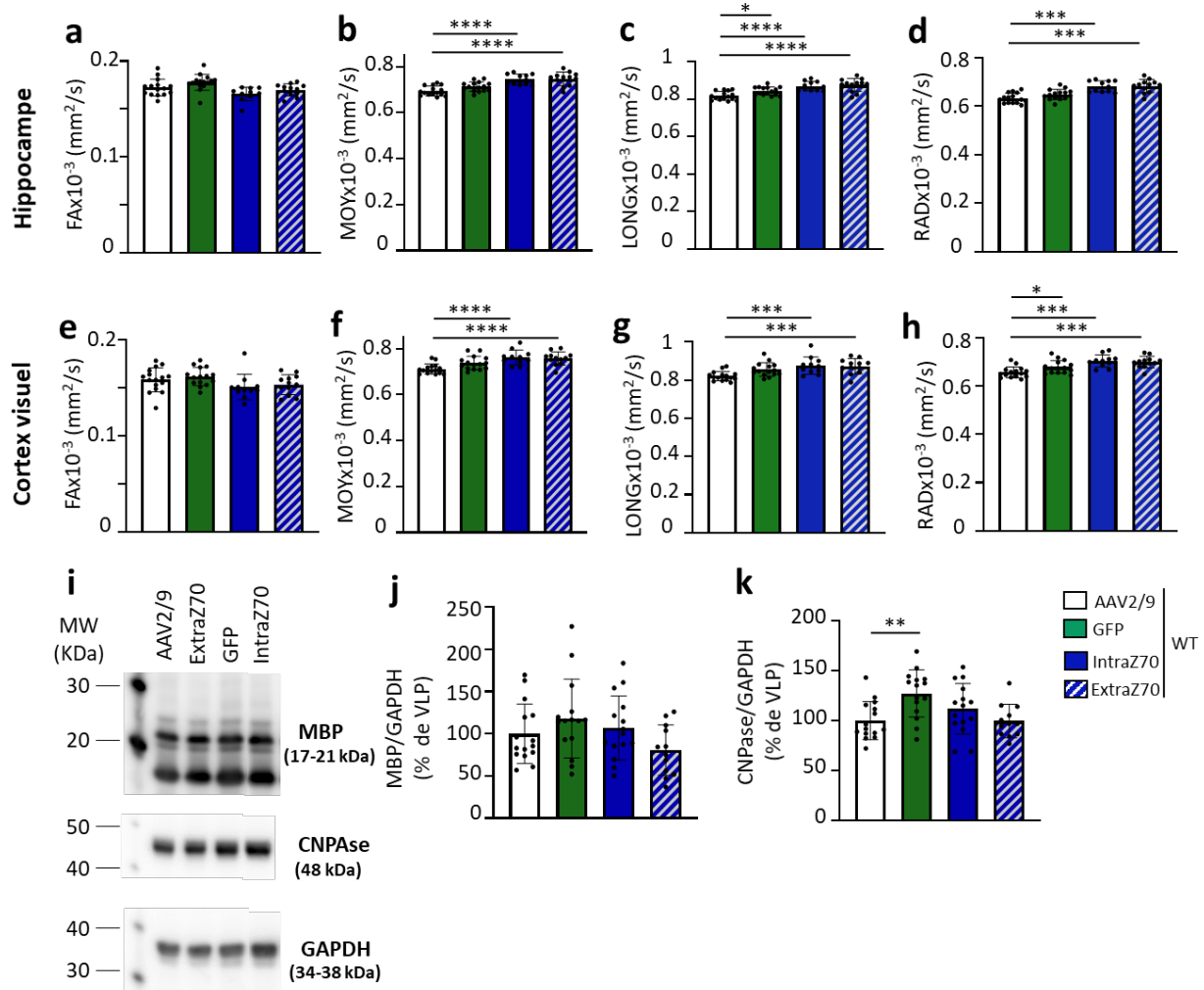


Figure 31: Intégrité axonale des souris WT

La séquence DTI obtenue par l'imagerie IRM permet l'analyse de plusieurs paramètres de diffusion : la FA (**a**, **e**), la MOY (**b**, **f**), la LONG (**c**, **g**), la RAD (**d**, **h**) dans l'hippocampe et le cortex visuel respectivement. Analyse post-mortem de lysat d'hippocampe par immunodétection des protéines MBP et CNPase par WB (**i**) et leur quantification respective (**j**, **k**). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$.

3. Etudes comportementales

La déplétion de la protéine tau physiologique, notamment dans des modèles KO-Tau, peut avoir des conséquences sur les fonctions motrices des animaux. Une faiblesse musculaire, un positionnement des membres inférieurs anormal et une locomotion altérée ont été démontré dans la littérature chez ces souris (Lei et al., 2014; Q.-L. Ma et al., 2014). Ainsi, les fonctions motrices des animaux injectés avec nos constructions ont été analysées. Un suivi mensuel du positionnement des pattes postérieures a été réalisé. Aucun changement n'a été détecté dans les souris des groupes intra et extraZ70 (Figure 32a). Sept mois après l'injection des AAVs dans l'hippocampe des souris WT, la locomotion des animaux a été étudiée dans un labyrinthe à champ ouvert (Openfield) et dans un labyrinthe en Y (Y maze). Pour chaque test, la distance parcourue et la vitesse de déplacement des animaux ont été mesurées et elles sont identiques pour tous les groupes (Figure 32 b, c, e et f). Ainsi, la surexpression de l'intra ou de l'extraZ70 dans le cerveau n'induit pas de troubles moteurs.

L'absence de protéine tau peut entraîner des altérations de la plasticité synaptique (T. Ahmed et al., 2014; Q.-L. Ma et al., 2014). Les VHHs étant exprimés à des niveaux élevés dans l'hippocampe, deux tests cognitifs impliquant cette région ont été réalisés. L'Openfield permet d'étudier l'anxiété des animaux (Seibenhener & Wooten, 2015), comportement ayant une composante hippocampique (Jimenez et al., 2018; Kheirbek et al., 2013; C. Wang et al., 2019). Il consiste à laisser les animaux explorer un carré de 49 cm de côté avec des murs opaques pendant dix minutes. L'analyse du thigmotactisme, soit la tendance naturelle des souris à passer plus de temps dans la zone proche des murs, permet de quantifier l'anxiété des animaux. Comme représenté dans la figure 32d, tous nos groupes d'animaux passent bien plus de temps dans la périphérie du labyrinthe (P) que dans son centre (C).

La mémoire spatiale est également un comportement nécessitant l'implication de l'hippocampe et peut être étudiée par l'utilisation d'un labyrinthe en Y (Kraeuter et al., 2019; Paul et al., 2009). Dans ce test, les animaux sont libres d'explorer deux bras du labyrinthe pendant cinq minutes. Après un retour dans leur cage, ils peuvent de nouveau explorer le labyrinthe mais avec le troisième bras ouvert cette fois. Le pourcentage de temps passé dans le nouveau bras par rapport au temps total dans le bras connu autre que le bras de départ et dans le nouveau bras donne un index de discrimination. Celui-ci est statistiquement comparé à 50%, soit le temps sans préférence pour un bras. Tous nos groupes de souris passent significativement plus de temps dans le nouveau bras (Figure 32g).

Ainsi bien que quelques effets aient été observés en imagerie cérébrale, aucune altération des fonctions motrices ou cognitives n'est observée dans les souris surexprimant l'intraZ70 ou l'extra Z70 dans l'hippocampe.

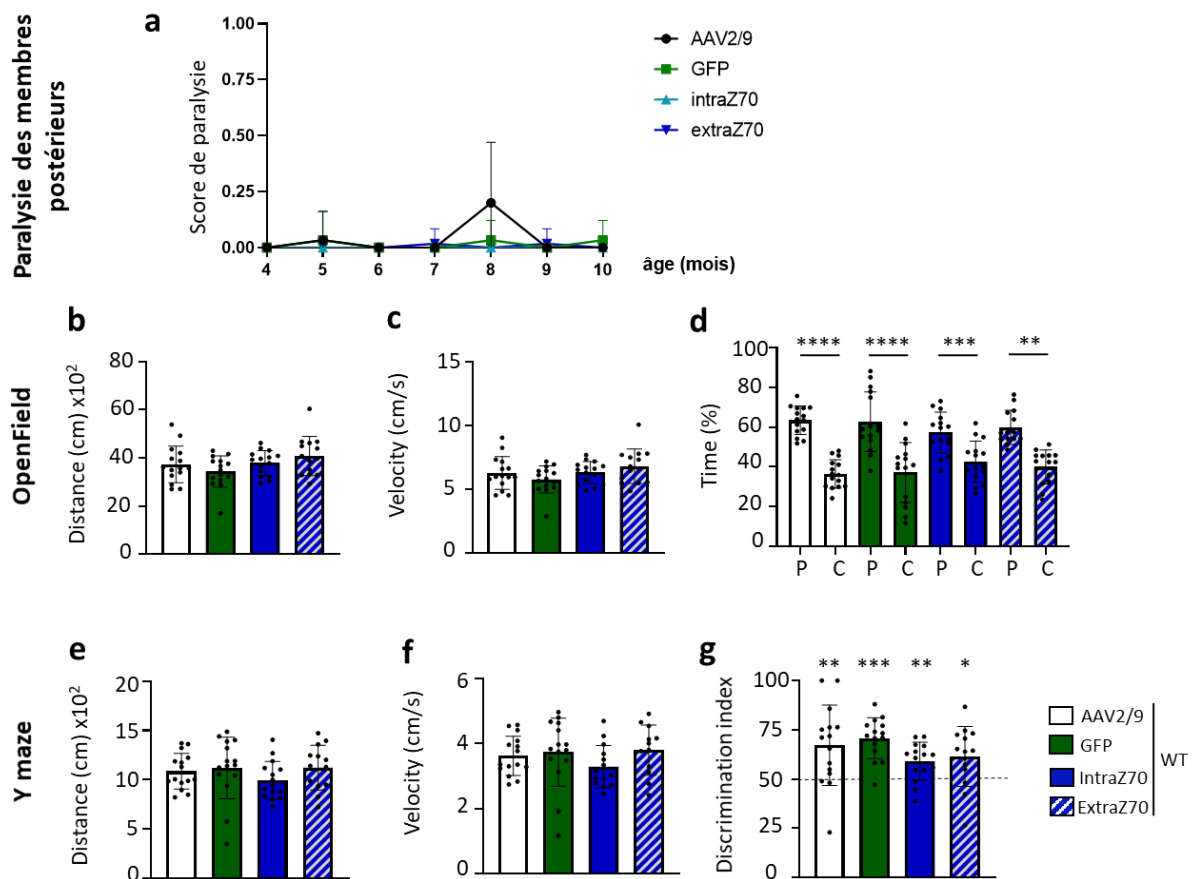


Figure 32: Effet de l'intra et extraZ70 sur les fonctions motrices et cognitives des souris WT

(a) Suivi mensuel de la position des membres inférieurs par un score de sévérité allant de 0 = position physiologique à 1 = position altérée. La distance parcourue **(b, e)** et la vitesse des animaux **(c, f)** sont mesurées pendant les 10 min du test d'Openfield ou les 5 min du test Y maze respectivement. **(d)** Dans l'Openfield le temps passé dans la zone périphérique (P) ou dans la zone centrale (C) est reporté au temps total. **(g)** Dans le Y maze, le temps passé dans le nouveau bras est reporté à la somme des temps dans les bras nouveau et autre dans la première minute. La valeur statistique représente la comparaison avec 50% du temps. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$.

4. Marqueurs plasmatiques

Pour compléter l'étude de l'effet des intra et extraZ70 sur la physiologie cérébrale, plusieurs biomarqueurs pouvant être dosés dans la périphérie ont été sélectionnés :

- NfL (Neurofilament à chaîne légère) : La rupture de la membrane axonale libère les neurofilaments dans le liquide interstitiel, puis dans le LCS et le sang. Le NfL étant la sous-unité de neurofilament ayant le poids moléculaire le plus faible par rapport aux sous-unités moyennes ou lourdes, sa diffusion dans le parenchyme est la plus aisée et elle est retrouvée augmentée dans les liquides biologiques après une dégénérescence axonale ou une mort neuronale (Alirezai et al., 2020; Bacioglu et al., 2016).
- GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) : Lors de la mort cellulaire et de la dégénérescence des neurones, les astrocytes prolifèrent et la quantité de GFAP augmente. Ainsi, une élévation de la GFAP détectée dans le sang est associée à de nombreuses pathologies neurodégénératives (Z. Yang & Wang, 2015).
- UCH-L1 (Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase L) : UCH-L1 est une des protéines solubles les plus abondantes dans le cerveau. D'une petite taille (27 kDa), elle est connue pour traverser la BHE et est référencée comme biomarqueur des traumatismes crâniens (Hellström et al., 2025). Son dosage peut être également corrélée à des diagnostics d'ischémie cérébrale (Ren et al., 2013) ou de sévérité de maladie de Parkinson (Ng et al., 2020).

Pour ce dosage, la technologie Simoa a été sélectionnée, permettant la détection de protéines à des niveaux inférieurs au femtomole. Une baisse significative de NfL dans les plasmas des groupes GFP et intraZ70 par rapport au contrôle AAV2/9 est observée, celle-ci ne traduit aucun effet délétère sur les neurones (Figure 33a). Aucune différence dans la quantité plasmatique de GFAP et de UCH-L1 n'est observée dans l'ensemble des groupes d'animaux (Figure 33 b et c). Ainsi aucun effet délétère de l'expression de l'intra ou de l'extra Z70 n'est observé lors de dosage de biomarqueurs de stress cérébral.

Le dosage plasmatique de la protéine tau totale n'est pas représentatif d'altérations neuronales ou de dégénération (Holper et al., 2022; Park et al., 2024). Il nous permet de visualiser un éventuel effet de l'intra ou extraZ70 sur la quantité de protéine tau périphérique. Cependant, aucune différence n'est observée (Figure 33d).

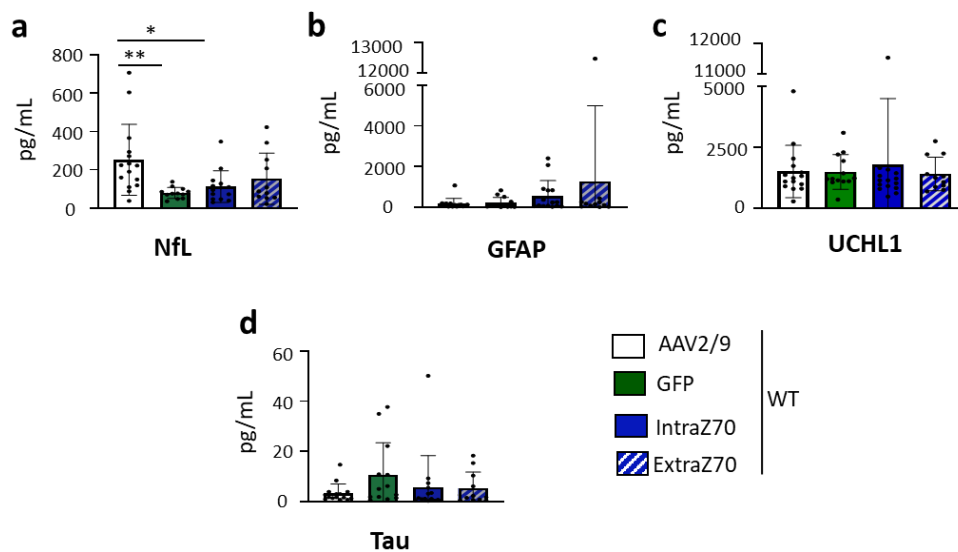


Figure 33: Dosage plasmatique de marqueurs périphériques sanguins

Un dosage plasmatique par technologie Simoa a permis de titrer la quantité de **(a)** NfL, **(b)** GFAP, **(c)** UCH-L1 et **(d)** tau. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$.

5. Marqueurs cérébraux

Pour confirmer l'absence de dommages neuronaux, plusieurs marqueurs des neurones ont été quantifiés par analyse biochimique du lysat d'hippocampe. La quantité de protéine tau ne varie pas entre les groupes (Figure 34a). Ainsi, l'intra et l'extraZ70 ne dégradent pas la protéine tau physiologique. Également, la quantité de protéine NeuN, présente dans le noyau et le cytoplasme périnucléaire des neurones, ne varie pas, suggérant une quantité constante de neurones dans l'hippocampe des animaux de tous les groupes (Figure 34b). Les synapses ont également été analysées par détection des protéines PSD95 et Snap25. Aucune variation de quantité de ces deux marqueurs synaptiques n'est observée (Figure 34 c et d).

Des marqueurs de stress cellulaire ont également été quantifiés. Aucune variation de la quantité LC3b n'est observée (Figure 34g). Le traitement avec les intra et extraZ70 n'active donc pas la voie de l'autophagie. Les protéines pEIF2 α et ATF4 sont impliquées dans la réponse intégrée au stress. Une augmentation d'ATF4 est observée dans les souris exprimant la GFP, mais cette voie n'est pas activée par nos deux VHHs (Figure 34 h et i).

La réponse inflammatoire a été étudiée en quantifiant la protéine GFAP, spécifique des astrocytes. La quantité de ces derniers ne varie pas entre les groupes (Figure 34e). Le traitement n'entraîne donc pas d'astrogliose. La quantité de microglie a été évaluée grâce à la protéine Iba1. Une augmentation

significative de celle-ci est observée en étude biochimique dans les hippocampes de souris injectées avec l'intraZ70 et avec l'extraZ70 (Figure 34f). Ce résultat est confirmé uniquement pour l'extraZ70 par analyse histologique de l'hippocampe (Figure 34j). La présence du fragment Fc sur le VHH Z70 extracellulaire entraîne bien l'activation de la microglie.

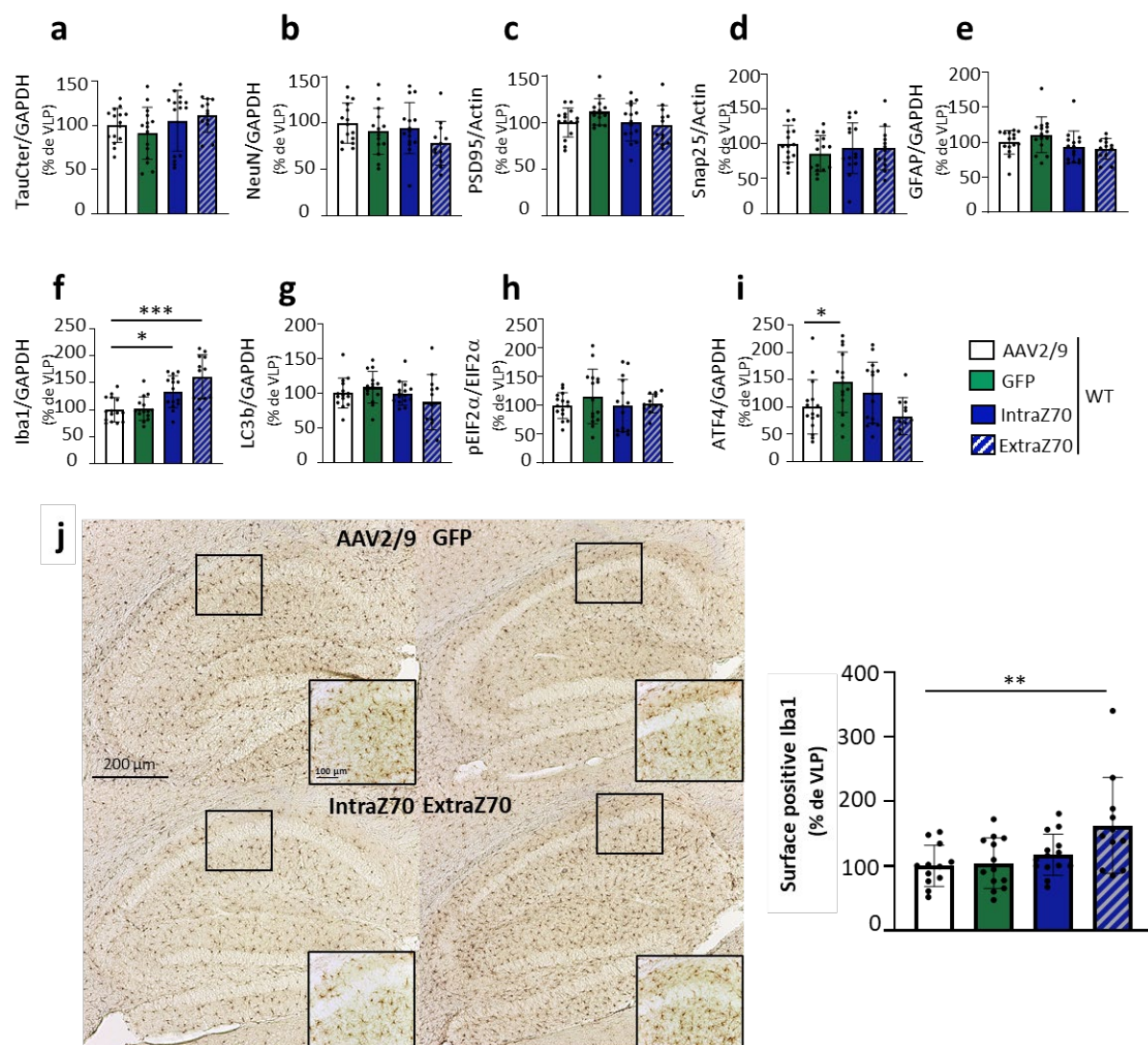


Figure 34: Effets des intra ou extraZ70 sur les marqueurs cérébraux

9 mois après injection des AAVs dans l'hippocampe de souris WT, les souris sont sacrifiées et leur hippocampe homogénéisé afin de quantifier des marqueurs cérébraux par WB. (a) TauCter, (b) NeuN, (c) PSD95, (d) Snap25, (e) GFAP, (f) Iba1, (g) LC3b, (h) pEIF2α et (i) ATF4. (j) Détection d'Iba1 par immunohistochimie sur des coupes sagittales de cerveaux. A gauche, une image représentative de chaque groupe avec un zoom dans le carré noir. A droite, quantification du marquage dans l'hippocampe sur l'ensemble des coupes. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe contrôle AAV2/9. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

6. Conclusion sur l'innocuité

Bien qu'un effet de nos VHHs Z70 ait été observé en imagerie cérébrale, aucune conséquence sur les animaux n'est observée en études comportementales motrices et cognitives. L'analyse des biomarqueurs périphériques et cérébraux d'intégrité neuronale ou de dommages cellulaires ne montre aucun effet toxique de la surexpression de l'intra ou de l'extraZ70. L'augmentation de la microglie pour l'extraZ70 était attendue. En effet, ces cellules expriment une grande quantité des récepteurs Fc.

Ainsi cette étude à long terme permet de conclure que l'expression de l'intra et de l'extraZ70, n'affecte pas le métabolisme général des animaux et est sûre pour une étude pré-clinique de l'immunothérapie contre la protéine tau.

C. Efficacité des VHHs Z70 à réduire la pathologie tau par un ciblage intra ou extracellulaire

En l'absence de nocivité de nos VHHs, les performances de l'intraZ70 et de l'extraZ70 à réduire la pathologie sont évaluées. Les vecteurs viraux AAV2/9 exprimant les VHHs Z70 ou contrôle sous forme intra ou extracellulaire (soit intraZ70, intraCtrl, extraZ70 ou extrCtrl) ont été injectés dans l'hippocampe de souris transgéniques Tg30 âgées d'un mois. Plusieurs critères d'évaluations basés sur le phénotype du modèle murin de tauopathie sont pris en compte pour définir l'efficacité du traitement : le comportement des animaux, l'atrophie cérébrale, et les lésions tau.

1. Amélioration du phénotype comportemental dans un modèle chronique de tauopathie

Les souris transgéniques Tg30 développent de la pathologie dans la moelle épinière avec le temps qui est corrélée avec une paralysie progressive des membres inférieurs (Leroy et al., 2007; Schindowski et al., 2006). La position des pattes postérieures de nos animaux est évaluée mensuellement. Aucune différence dans l'apparition de la paralysie n'est observée entre les groupes intraCtrl et intraZ70 (Figure 35a). Par contre, à 6 mois, les souris ayant reçu une injection intra-hippocampique d'AAV codant pour l'extraZ70 ont une paralysie significativement plus faible que les souris du groupe extraCtrl (Figure 35b). Malheureusement ce bénéfice n'est pas conservé dans le temps et les deux groupes présentent le même degré de paralysie les mois suivants. L'extraZ70 semble donc retarder l'apparition de la paralysie des membres inférieurs chez les souris Tg30.

Pour pouvoir tester les fonctions cognitives des souris Tg30, connaissant les lésions spinales des animaux nous nous sommes d'abord assurés de la locomotion des animaux lors des tests d'Openfield et de Y maze. Pour ces épreuves, des souris WT ayant reçu une injection intra-hippocampique d'AAV2/9 vide servent de contrôle. L'ensemble des animaux parcourent la même distance et ont une vitesse de déplacement similaire aux souris WT (Figure 35 c, d, f et g). Malgré une paralysie des membres inférieurs, à 8 mois les souris Tg30 sont donc capables de parcourir des labyrinthes et de réaliser des tests cognitifs sans problème de locomotion. Par conséquent, l'anxiété des souris a été quantifiée dans l'Openfield. Les souris WT- AAV2/9 passent bien plus de temps dans la zone proche des murs (Figure 35e, blancs), alors que les souris Tg30 des deux groupes contrôles ont perdu ce comportement naturel (Figure 35e, gris). Comme les souris WT, les souris Tg30 des groupes intraZ70 et extraZ70 retrouvent le comportement de thigmotactisme (Figure 35e, bleus).

La mémoire spatiale des souris a été étudiée à l'aide d'un Y maze, dans lequel les souris WT passent plus de temps dans le nouveau bras (Figure 35h, blanc) alors que les souris Tg30 des groupes intraCtrl et extraCtrl ne montrent pas de préférence pour le nouveau bras (Figure 35h, gris). Les souris des groupes intra et extraZ70 ont un indice de discrimination significativement différent de 50% (Figure 35h, bleus). Il n'y a pas de différence significative entre les indices de discrimination des groupes Z70 et leur contrôle respectif, l'effet sur la mémoire spatiale semble donc modeste mais néanmoins significatif pour les groupes intra et extraZ70.

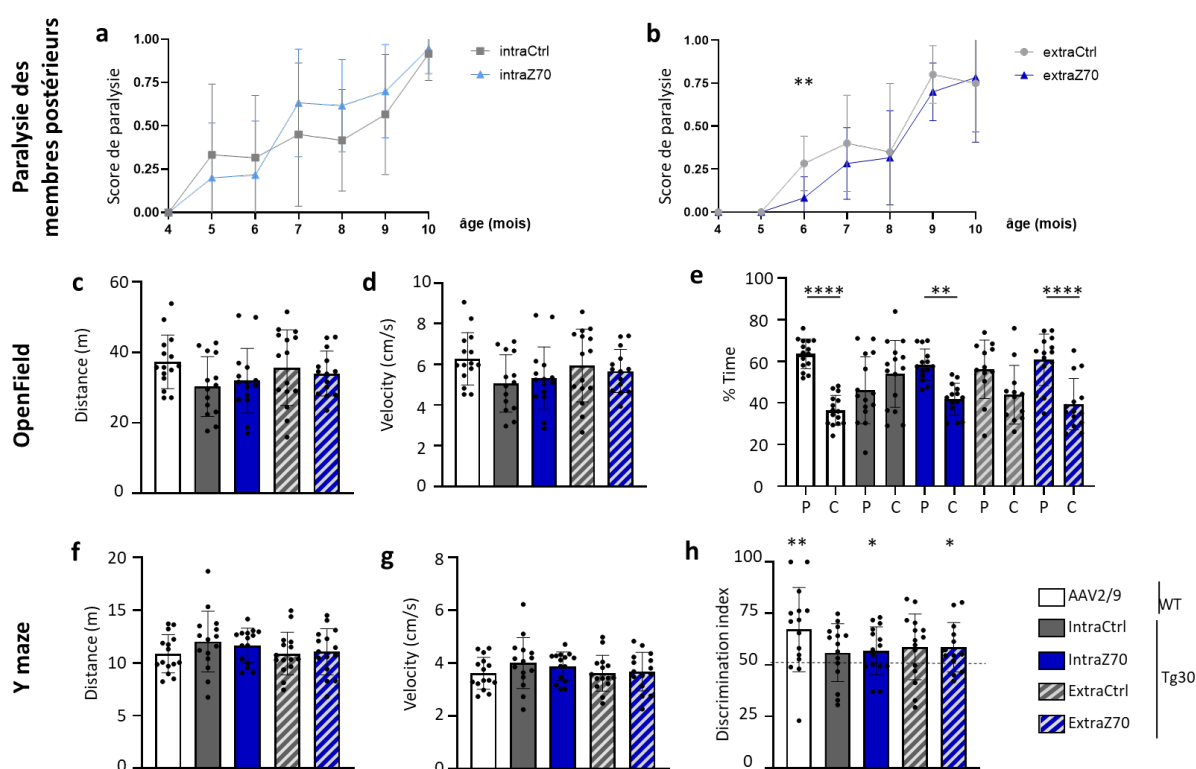


Figure 35: Effet des intra et extraZ70 sur les fonctions motrices et cognitives des souris Tg30

Suivi mensuel de la position des membres inférieurs par un score de sévérité allant de 0 = position physiologique à 1 = position altérée pour les souris ayant subi une injection intra-hippocampique d'AAV2/9 exprimant les VHHs (**a**) intraCtrl ou intraZ70, (**b**) extraCtrl ou extraZ70. La distance parcourue (**c, f**) et la vitesse des animaux (**d, g**) sont mesurées pendant les 10 min du test d'Openfield ou les 5 min du test Y maze respectivement. (**e**) Dans l'Openfield le temps passé dans la zone périphérique (P) ou dans la zone centrale (C) est reporté au temps total. (**h**) Dans le Y maze, le temps passé dans le nouveau bras est reporté à la somme des temps dans les bras nouveau et autre dans la première minute. La value statistique représente la comparaison avec 50% du temps. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

2. Prévention de l'atrophie cérébrale

A neuf mois, soit huit mois après l'injection des vecteurs viraux, une imagerie cérébrale par IRM a été réalisée sur les animaux pour évaluer le volume des différentes régions cérébrales. Les souris Tg30 intraCtrl et extraCtrl ont une atrophie de l'hippocampe, du thalamus et de différentes régions corticales par rapport aux souris WT (Figure 36a). Dans l'hippocampe, la région d'injection des AAVs, cette diminution du volume n'est plus observée chez les souris du groupe extraZ70 (Figure 36b). De plus, dans le cortex visuel, deuxième région présentant la plus forte expression de VHHs (Figure 25b), l'atrophie n'est plus visible dans les souris des groupes intraZ70 et extraZ70 (Figure 36c). Ces résultats suggèrent que le ciblage de la protéine tau dans la cellule ou dans le milieu extracellulaire par le VHH Z70 prévient l'atrophie cérébrale dans les souris Tg30.

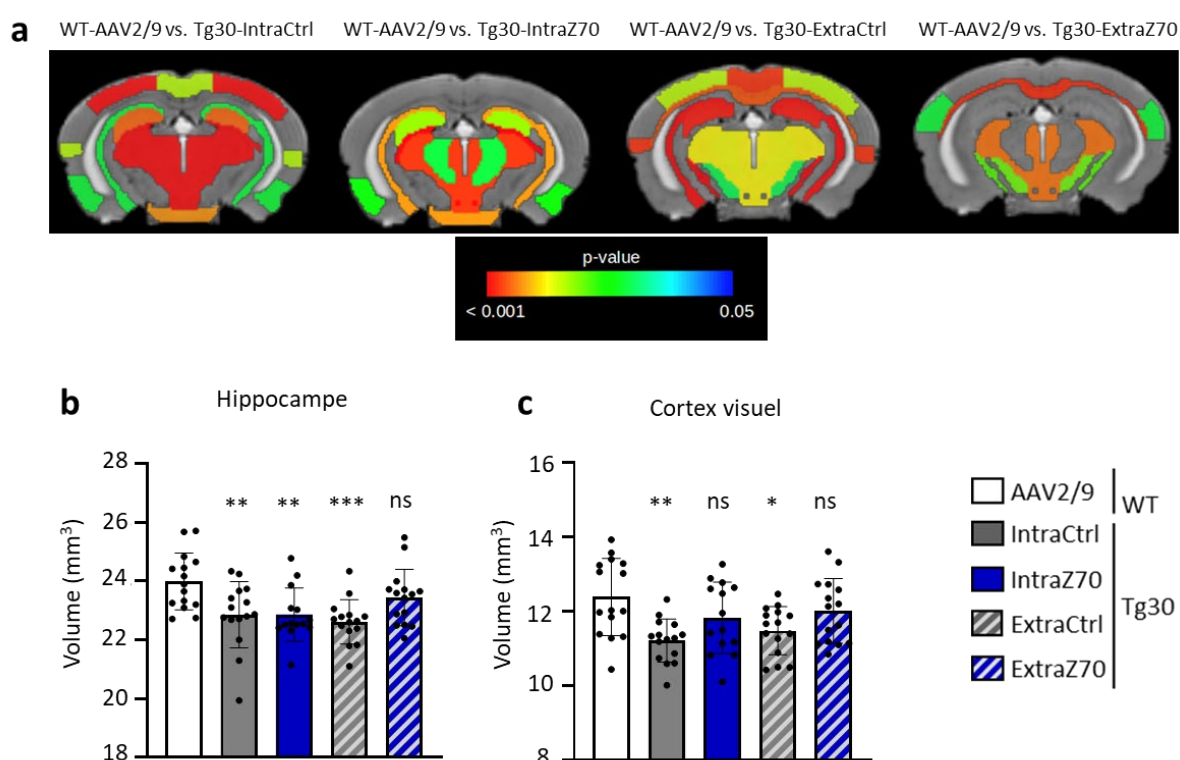


Figure 36: L'intra et l'extraZ70 améliore le volume cérébral des souris Tg30 par IRM

Huit mois après injection, l'imagerie cérébrale par IRM est utilisée pour comparer le volume des régions des souris WT-AAV2/9 par rapports aux différents groupes de souris Tg30. **(a)** Valeur statistique de p représentée par une échelle colorimétrique. Volume cérébral en mm³ pour **(b)** l'hippocampe ou **(c)** le cortex visuel. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; ns : non significatif.

Afin d'utiliser l'imagerie cérébrale des tenseurs de diffusion sur le modèle Tg30 et définir un éventuel effet sur cette lignée, une caractérisation du phénotype a dû être effectuée en amont. Pour cela, 20 souris WT (8 femelles et 12 mâles) et 21 souris Tg30 (7 femelles et 14 mâles) âgées de 9 mois ont subi

une analyse DTI en IRM. Malheureusement, aucune variation des paramètres de DTI n'a pu être mise en évidence entre les souris WT et Tg30 au niveau de l'hippocampe (Figure 37), rendant impossible la visualisation d'un effet bénéfique dans cette région. L'imagerie DTI n'a donc pas été retenue comme critère d'évaluation de l'efficacité des intra et extraZ70.

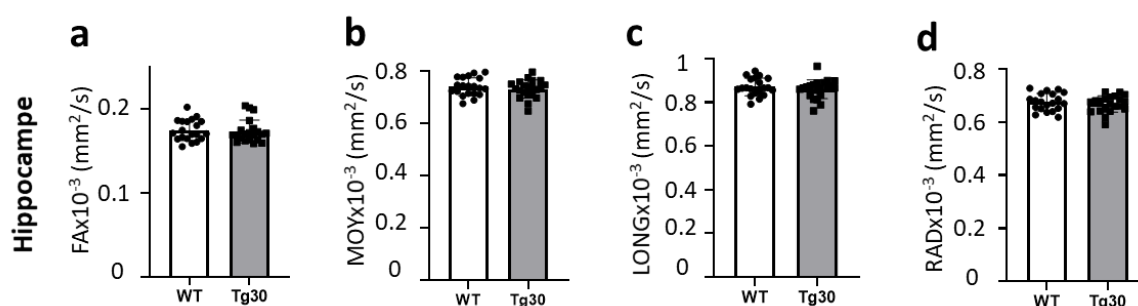


Figure 37: Caractérisation du phénotype des tenseurs de diffusion dans les souris Tg30

Imagerie IRM de souris WT ou Tg30 âgées de 9 mois pour l'analyse des différents paramètres de DTI : (a) fraction d'anisotropie, (b) diffusivité moyenne, (c) diffusivité longitudinale, (d) diffusivité radiale.

3. Effet des intra et extraZ70 sur la pathologie tau

Dans un premier temps, la quantification de la pathologie tau a été réalisée par un immunomarquage de l'hyperphosphorylation de la protéine avec l'anticorps AT8 reconnaissant les résidus sérine 202, thréonine 205 et sérine 208 phosphorylés (Malia et al., 2016; Mercken et al., 1992). Les souris du groupe intraZ70 présentent une diminution significative du marquage AT8 par rapport aux souris du groupe intraCtrl (Figure 38 a et b). Cet effet n'est pas retrouvé dans les souris du groupe extraZ70. Pour corrélérer la baisse de la quantité de protéine tau hyperphosphorylée avec la présence du VHH Z70, une quantification des lésions tau dans l'amygdale a été réalisée. Cette région présente de la pathologie dans le modèle Tg30 mais nous ne retrouvons pas d'expression de nos VHHs suite à l'injection intra-hippocampique (Figure 25b). Dans cette zone, aucune différence de quantité d'immunomarquage n'est retrouvée entre les groupes (Figure 38 c et d). La diminution du marquage AT8 dans l'hippocampe des souris du groupe intraZ70 est donc bien liée à la présence de l'intraZ70.

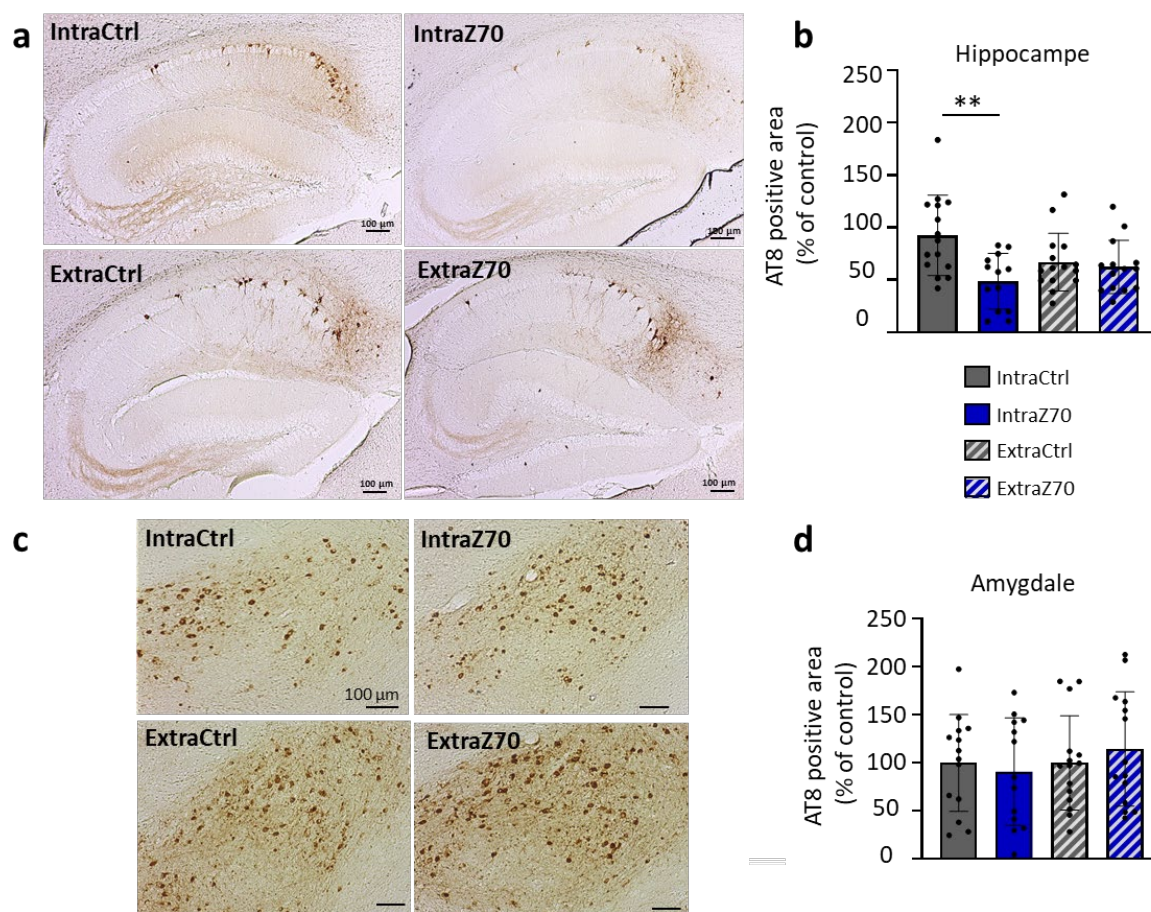


Figure 38: Lésions tau dans les régions avec ou sans expression des VHHs

(a) Illustrations de l'immunomarquage AT8 dans l'hippocampe. Echelle sur la figure. **(b)** Quantification par le logiciel Mercator du marquage AT8 dans l'hippocampe sur coupes sagittales de cerveau exprimée en pourcentage par rapport au groupe contrôle. **(c)** Illustrations de l'immunomarquage AT8 dans l'amygdale. Echelle sur la figure. **(d)** Quantification par la logiciel Mercator du marquage AT8 dans l'amygdale sur coupes sagittales de cerveau exprimée en pourcentage par rapport au groupe contrôle. ** : $p < 0,01$.

Pour visualiser la présence de l'intraZ70 et de sa cible, un co-marquage entre la protéine tau phosphorylée (grâce à l'anticorps AT8) et les intraVHHs (grâce à la mCherry) a été réalisé dans l'hippocampe (Figure 39a). Dans le groupe de souris injectées avec l'intraZ70, nous remarquons une augmentation significative du co-marquage du VHH avec le signal AT8 par rapport à la quantification dans le groupe intraCtrl à l'échelle tissulaire (Figure 39b). Pour démontrer un engagement de l'intraZ70 sur sa cible, une co-localisation à l'échelle cellulaire a été réalisée, soit un co-marquage des intraVHHs avec l'anticorps anti-RFP et des protéines tau phosphorylées avec l'anticorps AT8 observé par microscopie confocale. Ainsi, sur plan focal, les profils de superposition des fluorochromes ne

montrent pas de co-localisation entre AT8 et l'intraCtrl (Figure 39c haut). Par contre, l'intraZ70 et AT8 ont des profils se superposant (Figure 39c bas), suggérant un engagement de l'intraZ70 sur sa cible.

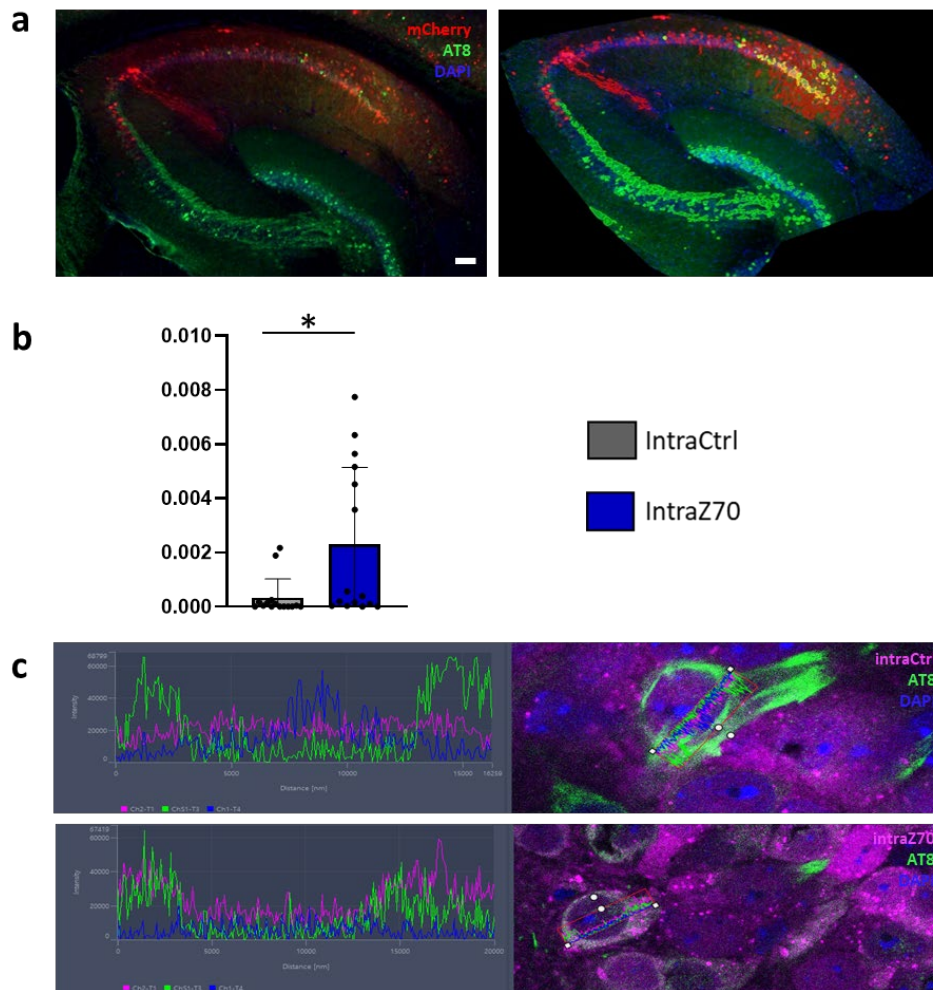


Figure 39: Co-marquage entre les intraVHHs et AT8

9 mois après l'injection dans l'hippocampe de l'AAV2/9 exprimant les VHHs intraCtrl et intraZ70, les animaux ont été sacrifiés et des analyses par immunofluorescence ont été réalisées sur des coupes de cerveau. **(a)** A gauche : Fluorescence de la mCherry (rouge) fusionnée aux intraVHHs et immunomarquage de phosphoTau par l'anticorps AT8 (vert). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (en bleu). Echelle = 100 μ m. A droite : Les images ont été traitées par le script ImageJ. L'hippocampe est extrait de l'image, un seuillage pour marquage rouge et un second pour le marquage vert sont appliqués. Les zones en jaune représentent la présence des 2 marquages. **(b)** Quantification de la surface des zones jaunes rapportées à la taille totale de la région des images traitées par le script. **(c)** Immunomarquage de la mCherry (en rose) ou de phosphoTau par l'anticorps AT8 (en vert). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI (en bleu). La superposition des fluorochromes analysée par le logiciel ZEN est représentée à gauche. * : $p < 0,05$.

Pour caractériser l'effet de l'intraZ70 sur la pathologie tau, d'autres formes pathologiques de la protéine tau ont été quantifiées. L'anticorps MC1 permet une visualisation de la conformation pathologique de la protéine tau (Jeganathan et al., 2008). L'immunomarquage réalisé sur des coupes de cerveaux des animaux des groupes intraVHHs n'a montré aucune différence entre le VHH Z70 et son contrôle (Figure 40a). Le même résultat a été retrouvé avec l'anticorps spécifique des agrégats AT100 (Figure 40b), ciblant les résidus thréonine 212 et sérine 214 phosphorylés (Zheng-Fischhöfer et al., 1998). L'effet de l'intraZ70 observé par études histologiques est donc restreint à l'hyperphosphorylation de la protéine.

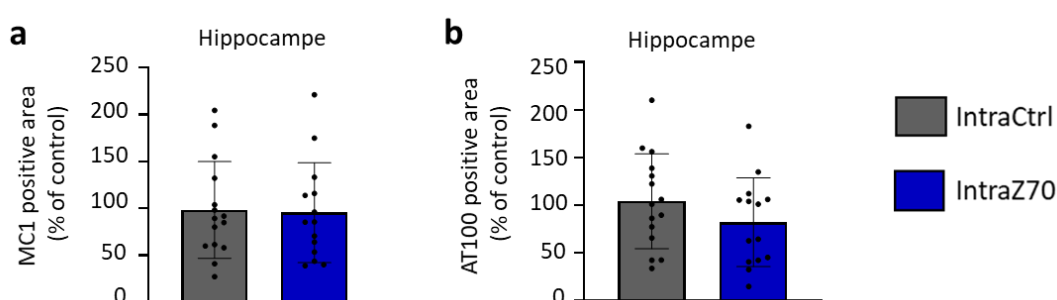


Figure 40: Effet de l'intraZ70 sur la protéine tau pathologique

9 mois après l'injection dans l'hippocampe de l'AAV2/9 exprimant les VHHs intraCtrl et intraZ70, les animaux ont été sacrifiés et des immunomarquages ont été réalisés sur des coupes de cerveau. Quantification de l'hippocampe par le logiciel Mercator de l'immunomarquage avec l'anticorps (a) MC1 ou (b) AT100. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au groupe intraCtrl.

Les phosphorylations des sérines 396 et 199 sont d'autres marqueurs de l'hyperphosphorylation de la protéine tau en conditions pathologiques (T. Li & Paudel, 2006; Maurage et al., 2003). Une étude biochimique des lysats d'hippocampe des souris des groupes intraCtrl et intraZ70 a été réalisée par électrophorèse monodimensionnelle. Aucune différence de la quantité de phosphorylation de ces résidus n'a été observée (Figure 41 a et b). Afin de caractériser la pathologie dans les animaux injectés, une séparation des fractions solubles et insolubles à partir des lysats d'hippocampes a permis une quantification sélective des agrégats par immunomarquage avec l'anticorps AT100. Cependant aucune différence n'est observée entre les deux groupes d'animaux (Figure 41c). Les bénéfices du VHH intraZ70 sur les lésions tau n'ont donc été observé que par analyse anatomopathologique avec l'anticorps AT8.

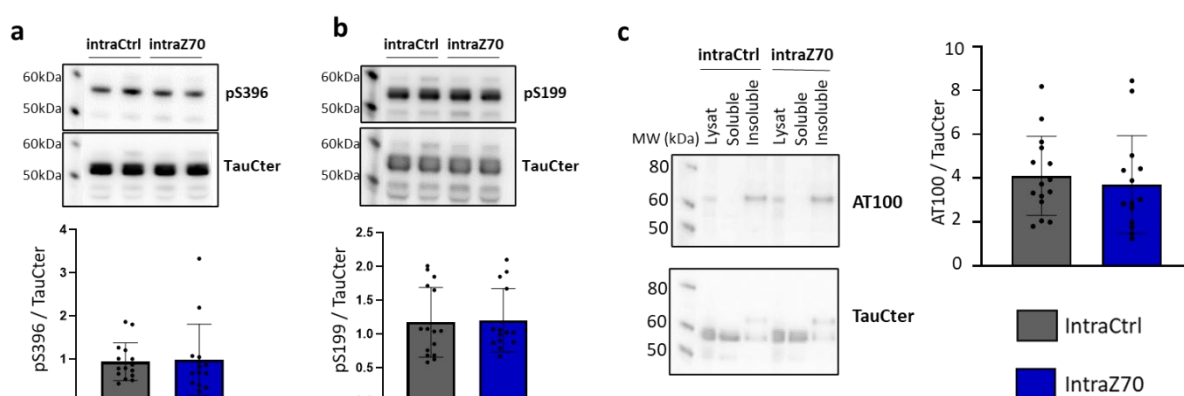


Figure 41: Effet de l'intraZ70 sur d'autres marqueurs cérébraux de la pathologie tau

9 mois après l'injection dans l'hippocampe de l'AAV2/9 exprimant les VHHs intraCtrl et intraZ70, les animaux ont été sacrifiés et des lysats d'hippocampe ont été analysés en WB. Une quantification de l'immunomarquage **(a)** phosphoS396 rapporté à l'immunomarquage TauCter ou **(b)** phosphoS199 rapporté à l'immunomarquage TauCter a été réalisée. **(c)** Une séparation des fractions solubles et insolubles du lysat d'hippocampe a été réalisée et étudiée en WB. Une quantification de l'immunomarquage de l'anticorps AT100 rapporté à l'immunomarquage TauCter a été réalisée.

Pour caractériser les effets de l'intraZ70 sur la protéine tau, une étude de la quantité d'espèces pro-nucléantes a été menée sur un modèle de nucléation *in vitro*. Les cellules TAU RD P301S FRET sont des biosenseurs de la nucléation de la protéine tau. Elles expriment les domaines de liaison aux microtubules liés à un fluorochrome bleu (CFP) ou jaune (YFP). Lorsqu'une nucléation est enclenchée par des facteurs pro-nucléants, un rapprochement de ces fluorochromes provoquent un transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) et qui peut être quantifié par cytométrie (Figure 42a). Lorsque du lysat d'hippocampe de souris Tg30 du groupe intraCtrl est transfecté sur les cellules, environ 15% émettent un signal FRET (Figure 42b gris). Cependant, aucune diminution de la quantité de signal FRET n'est remarqué lorsque du lysat d'hippocampe de souris du groupe intraZ70 est transfecté (Figure 42b bleu). Le VHH intraZ70 ne diminue donc pas la quantité de formes pro-nucléantes de la protéine tau.

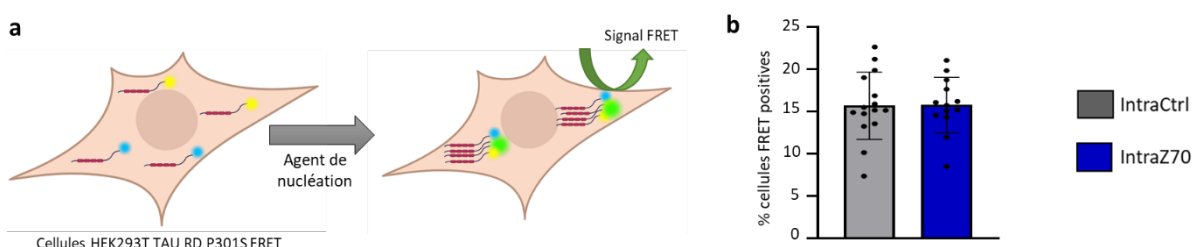


Figure 42: Analyse des espèces pro-nucléantes dans les souris des groupes intraVHHs

(a) Représentation schématique du principe des cellules biosenseurs TAU RD P301S FRET **(b)** Quantification du pourcentage de cellules positives émettant un signal FRET après lipofection du lysat d'hippocampe de souris 9 mois après injection des AAVs intraCtrl ou intraZ70.

Plusieurs critères d'évaluation indiquent un effet bénéfique des VHHs intra et extraZ70, mais celui-ci reste modeste. Bien que l'expression des VHHs soit pérenne dans le temps, le modèle de souris Tg30 surexprime continuellement la protéine tau mutée et développe une pathologie croissante avec le temps. La cinétique choisie dans le cadre de cette étude chronique peut donc être trop longue et il est possible que la pathologie ait pris l'ascendant sur l'effet des VHHs Z70. Pour tester cette hypothèse, une nouvelle cinétique a été mise en place avec une étude plus précoce des animaux.

4. Modulation de la chronicité du modèle Tg30

Ainsi, des souris Tg30 âgées de 1 mois ont reçu des injections intra-hippocampiques d'AAV2/9 exprimant les VHHs intraCtrl, intraZ70, extraCtrl et extraZ70 (le nombre d'animaux par groupe est de 8, 8, 8 et 7 respectivement). Un effet bénéfique de l'extraZ70 sur la paralysie des membres inférieurs ayant été observé à 6 mois dans le précédent modèle chronique (Figure 35b), l'analyse de la pathologie tau sera effectuée à cet âge.

Malheureusement, le suivi mensuel de la paralysie des membres inférieurs n'a pas permis de reproduire le retard d'apparition des troubles moteurs obtenu dans la cohorte précédente (Figure 43a). La variabilité entre les lots des animaux pourrait expliquer cette résultante. Également, l'évaluation des lésions tau par l'immunomarquage par l'anticorps AT8 des coupes de cerveaux 5 mois après l'injection ne montre pas de différence entre les groupes (Figure 43b).

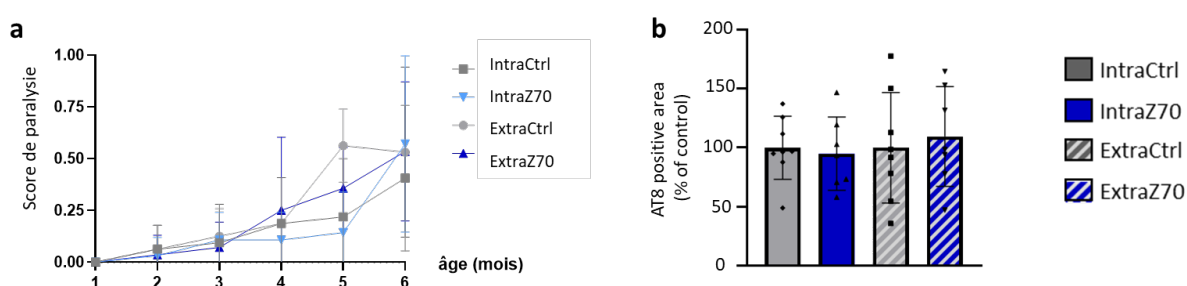


Figure 43: Etude chronique de 6 mois des souris Tg30 exprimant les intra et extraVHHs

(a) Suivi mensuel de la position des membres inférieurs par un score de sévérité allant de 0 = position physiologique à 1 = position altérée pour les souris ayant reçu une injection intra-hippocampique d'AAV2/9 exprimant les VHHs intraCtrl, intraZ70, extraCtrl ou extraZ70. **(b)** Quantification par le logiciel Mercator du marquage AT8 dans l'hippocampe sur coupes sagittales de cerveau exprimée en pourcentage par rapport aux groupes contrôles intraCtrl ou extraCtrl.

Dès lors, l'effet modeste de l'intraZ70 sur la pathologie tau observé dans la cinétique de 9 mois ne semble pas être la conséquence de l'accumulation trop longue de la pathologie tau dans le cerveau des souris transgéniques. L'extraZ70, quant à lui, n'est pas à même de réduire la pathologie quelle que soit la cinétique. La souris Tg30 présente une forte accumulation intracellulaire de protéine pathologique, celle-ci ne pouvant être ciblée par l'extraZ70 qui est sécrété dans le milieu extracellulaire. Les modèles chroniques utilisés dans cette étude ne semblent donc pas être les plus adaptés afin d'évaluer les capacités de l'extraZ70 à réduire la pathologie tau.

5. Ciblage des espèces extracellulaires de protéine tau par l'extraZ70

Pour tester cette hypothèse, le modèle de nucléation *in vivo* développé au laboratoire a été choisi. Il consiste à injecter du lysat de cerveau de patient atteint de MA dans l'hippocampe de jeune souris Tg30. A cet âge la pathologie est encore très mineure. Il est alors possible d'évaluer l'impact du lysat MA, délivré dans le liquide interstitiel et qui sera capturé par les cellules, sur l'évolution de la pathologie tau. De la même manière, ce modèle permet de tester des approches thérapeutiques visant à bloquer des espèces de tau dans le liquide interstitiel et ainsi à prévenir la nucléation de tau. Ce modèle a déjà permis de tester l'efficacité d'un anticorps conventionnel ciblant la protéine tau ou du VHH Z70 sous forme intracellulaire (Albert et al., 2019; Danis et al., 2022).

Des vecteurs lentiviraux exprimant les constructions extraCtrl ou extraZ70 ont été injectés dans l'hippocampes de souris Tg30 âgées d'un mois. Deux semaines plus tard, le lysat de cerveau de patient atteints de MA a été inoculé aux mêmes coordonnées. Un mois plus tard, les animaux sont sacrifiés et un immunomarquage de la protéine tau hyperphosphorylée avec l'anticorps AT8 est réalisé sur les coupes de cerveau des souris (Figure 44a). La quantification de ce marquage montre une diminution significative de la pathologie tau dans l'hippocampe des souris du groupe extraZ70 comparée au groupe extraCtrl (Figure 44b). Ainsi, l'extraZ70 est bien capable de réduire la pathologie tau en ciblant les espèces de tau apportées par le lysat de patient atteint de MA et présentes dans le liquide interstitiel.

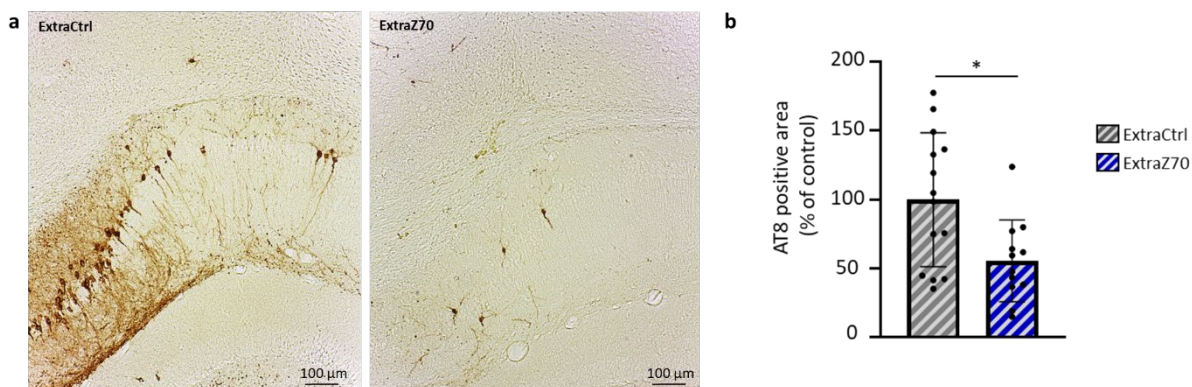


Figure 44: Lésions tau après expression des extraVHHs dans un modèle de nucléation

(a) Images représentatives de l'immunomarquage AT8 dans l'hippocampe. **(b)** Quantification par le logiciel Mercator du marquage AT8 dans l'hippocampe sur coupes sagittales de cerveau exprimée en pourcentage par rapport au groupe contrôle. * : $p < 0,05$.

6. Conclusion sur l'efficacité

Dans un modèle chronique à long terme dans les souris Tg30, l'intraZ70 est capable de réduire l'atrophie corticale, de restaurer les comportements sauvages d'anxiété et de mémoire spatiale et de diminuer certaines hyperphosphorylations de la protéine tau. L'intraZ70 n'ayant pas d'effet sur les indicateurs des PHFs, il ne peut agir sur l'agrégation de la protéine dans les souris Tg30.

L'extraZ70, ciblant la protéine tau dans le milieu extracellulaire, réduit également les phénotypes comportementaux ainsi que l'atrophie hippocampique et corticale mais n'a pas d'effet sur la pathologie tau dans le modèle Tg30 chronique. L'activation de la microglie suite à son expression suggère un mode d'action via la réponse inflammatoire et une possible activation de la clairance. Par ailleurs, son efficacité dans le modèle de nucléation de même que de récents résultats sur le mécanisme d'action des VHHs sur des cultures primaires de neurones (Danis et al., 2025), suggèrent un mode d'action sur l'entrée de la protéine tau dans les cellules.

In fine, les intra et extraVHHs anti-tau utilisés dans cette étude agissent sur la pathologie tau et ses effets ainsi que sur les mécanismes prion-like de manières différentes mais qui peuvent être complémentaires.

D. Le Z70 peut-il se passer de protéine rapportrice ?

L'étude de l'innocuité ne montre également pas d'effet délétère de la mCherry pour l'intraZ70. A long terme, ce fluorophore ne peut être gardé pour une perspective clinique. Cependant, un problème de stabilité du VHH Z70 sans protéine rapportrice a été observé. En effet, le VHH Z70 recombinant est bien reconnu à environ 15 kDa par l'anticorps anti-VHH mais lors de son expression dans les cellules il n'est pas détecté lorsqu'il n'est pas fusionné avec une protéine rapportrice, contrairement à sa version fusionnée avec la mCherry observée proche de 40 kDa (Figure 45a). Pour tester l'hypothèse d'une dégradation rapide par la cellule, une cinétique d'expression a été réalisée. Le VHH Z70 seul n'est jamais retrouvé dans les cellules, contrairement au VHH fusionné à la mCherry (Figure 45b) dont l'expression est observée 24h après l'infection par le vecteur lentiviral. Ces résultats suggèrent que le VHH Z70 n'est pas exprimé puis dégradé par la cellule. L'absence de détection évoque plutôt un problème de stabilité du VHH Z70.

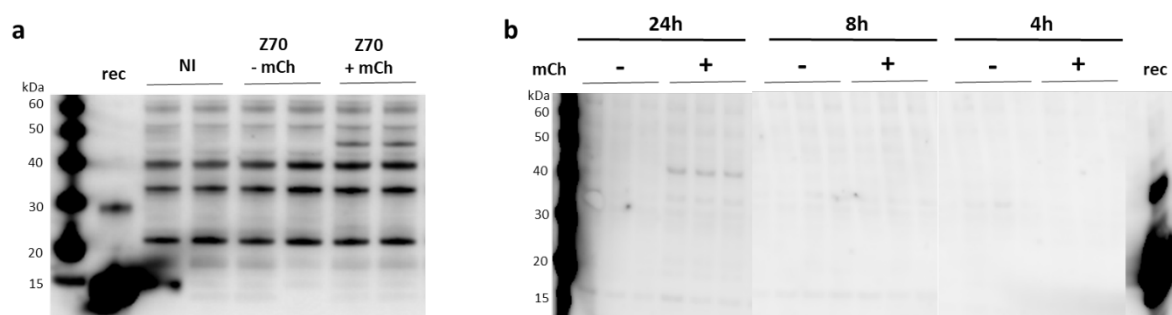


Figure 45: Expression du VHH Z70 avec et sans protéine rapportrice

Des cellules HEK293T ont été transfectées avec des vecteurs lentiviraux exprimant le Z70 avec et sans fusion avec la mCherry (mCh). **(a)** Electrophorèse monodimensionnelle du lysat cellulaire 72h après l'injection et immunomarquage par l'anticorps anti-VHH. NI correspond aux cellules non infectées, rec au VHH Z70 sous forme de protéine recombinante. **(b)** Electrophorèse monodimensionnelle du lysat cellulaire 24h, 8h ou 4h après l'injection et immunomarquage par l'anticorps anti-VHH.

L'étude *in vivo* précédente a été réalisée en parallèle avec la construction intraZ70 sans fusion avec la mCherry. Les animaux Tg30 ont été injectés à 1 mois avec les AAV2/9 exprimant les intraCtrl et intraZ70 avec ou sans fusion avec la protéine rapportrice mCherry. Les tests comportementaux sept mois après injection ne montre pas de bénéfice sur le comportement anxieux via le test d'Openfield chez les animaux du groupe intraZ70 sans mCherry alors que le groupe intraZ70 avec mCherry retrouve un thigmotactisme normal comme démontré précédemment (Figure 46a). Les mêmes résultats sont observés lors de l'étude de la mémoire spatiale par le test du Y maze (Figure 46b). La quantification

des lésions tau par l'anticorps AT8 sur les coupes de cerveau neuf mois après l'injection ne relève pas non plus de différence entre l'intraZ70 sans mCh et son contrôle contrairement à l'intraZ70 avec mCherry (Figure 46c). Ainsi, aucun des effets de l'intraZ70 sur le phénotype des souris Tg30 n'a été observé avec sa version sans protéine rapportrice. Ces résultats corroborent les données *in vitro* sur la stabilité du VHH Z70.

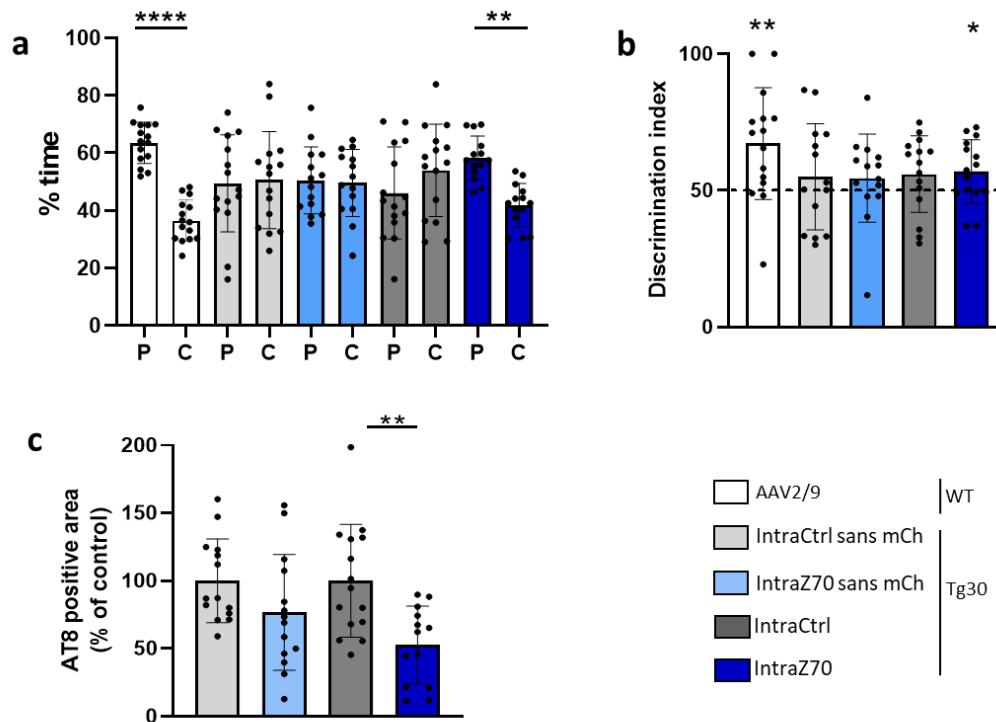


Figure 46: Effet des intraVHHs avec ou sans protéine rapportrice dans le modèle Tg30 chronique

Les AAV2/9 exprimant l'intraCtrl et l'intraZ70 avec et sans fusion avec mCherry ont été injectés dans l'hippocampe de souris Tg30. Sept mois post-injection, les animaux passent des tests comportementaux. **(a)** Dans l'Openfield le temps passé dans la zone périphérique (P) ou dans la zone centrale (C) est reporté au temps total. **(b)** Dans le Y maze, le temps passé dans le nouveau bras est reporté à la somme des temps dans les bras nouveau et autre dans la première minute. La valeur statistique représente la comparaison avec 50% du temps. **(c)** Quantification par le logiciel Mercator du marquage AT8 dans l'hippocampe sur coupes sagittales de cerveau exprimée en pourcentage par rapport aux groupes contrôles neuf mois après l'injection. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$.

Des vecteurs lentiviraux exprimant l'intraZ70 avec ou sans mCherry ont été injectés dans l'hippocampe de souris Tg30. Un mois plus tard, les animaux ont été sacrifiés et un immunomarquage par l'anticorps anti-VHH réalisé sur des coupes de cerveau. Alors que le VHH Z70 avec protéine rapportrice est visualisé au niveau de l'injection à la fois avec l'anticorps anti-VHH avec la fluorescence endogène de la mCherry (Figure 47a), le VHH Z70 sans mCherry n'est pas retrouvé (Figure 47b).

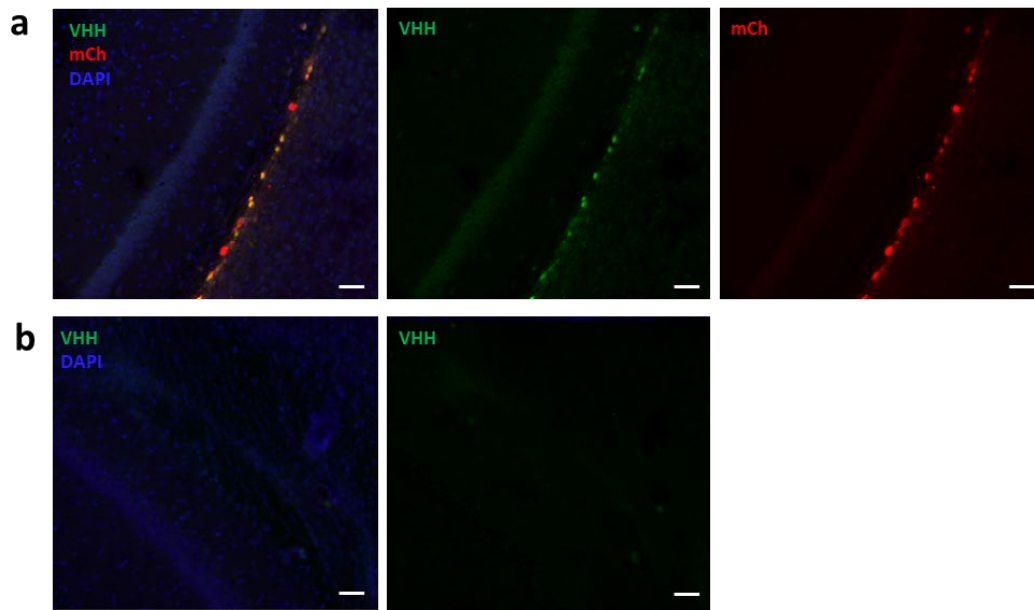


Figure 47: Détection du VHH Z70 exprimé chez la souris

1 mois après injection des vecteurs lentiviraux exprimant l'intraZ70 avec (a) ou sans (b) mCherry, les animaux sont sacrifiés et un immunomarquage des VHHs est réalisé sur des coupes de cerveau. Echelle = 100 μ m.

L'ensemble de cette étude sur la stabilité du VHH Z70 sans protéine rapportrice dans les cultures cellulaires et les animaux suggère une mauvaise conformation lors d'une expression dans les cellules eucaryotes.

*

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le développement de thérapies pour combattre la MA et les tauopathies est un défi pour aider des millions de patients à travers le monde. Les molécules actuellement sur le marché ne montrent qu'une faible efficacité et beaucoup d'essais cliniques ont été abandonnés ces dernières années. De plus en plus de stratégies thérapeutiques ciblent la protéine tau. Sa présence est corrélée aux symptômes cliniques et elle est une cible commune pour toutes les tauopathies. L'hypothèse d'une progression de la pathologie selon un mode prion permet de mieux comprendre et modéliser les mécanismes pathologiques. La première étape, la nucléation, est l'induction d'une conformation anormale de la protéine tau physiologique induite par des espèces pathologiques pro-nucléantes générant des formes intracellulaires pathologiques (intraTau). Certaines de ces espèces sont ensuite transférées de cellule en cellule, aboutissant à une présence de formes pathologiques de protéine tau dans le liquide interstitiel (extraTau) et entraînant une propagation de la pathologie (Braak & Braak, 1991; Duyckaerts et al., 2009). Ces dernières sont la cible principale des immunothérapies avec des anticorps conventionnels. Leur élimination permettrait de réduire la progression des pathologies qui reproduit un schéma spatio-temporel spécifique, comme la MA. Cette progression hiérarchique est également décrite dans la PSP, la DGA et la maladie de Pick (Brendel et al., 2018; Cope et al., 2018; Irwin et al., 2016; Radford et al., 2023; Y. Saito et al., 2004) mais la protéine tau extracellulaire n'ayant pas été retrouvée augmentée dans ces pathologies, l'hypothèse prion-like est toujours discutée (Barthélemy, Fenaille, et al., 2016; Leroux et al., 2022). Ainsi le développement d'outils ciblant l'intraTau reste nécessaire et pourrait être bénéfique à l'ensemble des tauopathies, MA incluse. Dans le cadre de ce projet de thèse, des outils immunologiques différents des anticorps conventionnels, les VHHs, ont été sélectionnés pour cibler la protéine tau. Ces outils immunologiques présentent de nombreux avantages par rapport aux anticorps conventionnels, parmi lesquels de meilleures solubilité et stabilité intracellulaires (Muyldermans, 2013). L'objectif de ce travail était d'étudier les capacités du VHH Z70 à réduire la pathologie tau à l'intérieur des cellules ou dans le liquide interstitiel sans provoquer de dommages au fonctionnement cérébral.

1. Les outils de modélisation

Dans un premier temps, l'étude de l'expression des constructions nous confirme que l'intra et l'extraZ70 ont des voies de prise en charge cellulaire distinctes et valide ainsi leur adressage (Figures 23, 26 et 27). Pour tester l'efficacité de ces VHHs à long terme, une expression à la majeure partie du SNC et stable dans la durée est nécessaire. Le choix s'est porté sur l'utilisation des vecteurs viraux

AAVs, notamment le vecteur pseudotypé AAV2/9. Les AAVs présentent de nombreux avantages. Leur génome se présente sous forme d'épisome extra-chromosomique, prévenant le risque de mutagenèse insertionnelle observée lors de thérapie génique avec des vecteurs lentiviraux (Cavazzana-Calvo et al., 2000, 2010; Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Les vecteurs AAVs permettent une expression longue du transgène (Muhuri et al., 2022) que nous avons confirmé avec une stabilité de l'épisome et une expression jusqu'à 9 mois après l'injection (Figure 25).

Les propriétés de transport antérograde et rétrograde des AAVs leur permettent également de mieux diffuser dans le tissu. Dans nos expérimentations, les injections intracérébroventriculaires des quatre sérotypes à tropisme pour le SNC ne permettent pas une expression du transgène dans le cerveau malgré une description de cette méthode dans la littérature (Belur et al., 2021; Hughes et al., 2018). Néanmoins l'injection intra-hippocampique d'AAV2/9 permet de couvrir l'ensemble de l'hippocampe, région la plus touchée par la pathologie tau dans les souris Tg30, ainsi qu'une partie du cortex (Figure 24). Cependant l'objectif de couvrir l'ensemble du SNC n'a pas été atteint. Les outils diagnostiques aujourd'hui disponibles ne permettent pas de détecter la maladie précocement et les patients diagnostiqués ne présentent pas une pathologie tau restreinte à une seule région cérébrale.

Bien que les injections intra-crâniées soient déjà utilisées en clinique dans le traitement de maladies neurodégénératives, ce geste lourd doit être évité lorsque cela est possible. Une injection systémique efficace permettrait une atteinte de l'ensemble du SNC et une modélisation plus proche de ce qui est faisable en clinique.

1.1. Passage de la BHE par les AAV

Contrairement à la majorité des sérotypes d'AAV qui montre une faible efficacité pour passer à travers la BHE lors d'une injection périphérique, l'AAV9 peut atteindre le SNC suite à une délivrance par voie intraveineuse (Dehay et al., 2012; Foust et al., 2009; H. Fu et al., 2011). Une thérapie génique contre l'amyotrophie spinale par injection intraveineuse d'AAV9 est même validée en clinique (Mendell et al., 2017).

Pour évaluer cette possibilité, l'AAV2/9 exprimant l'intraZ70 a été injecté dans la veine latérale de la queue de souris. Un mois plus tard, le cerveau a été extrait et la séquence de la mCherry (fusionnée au VHH) détectée par RT-PCR (Figure 48). Une grande quantité de transgène est observée dans le rein. Dans le cerveau, le transgène est détectée dans les régions sous-corticales et en quantité plus faible dans l'hippocampe et le cortex. L'analyse de la protéine intraZ70 par tests biochimiques n'a pas permis de valider sa présence.

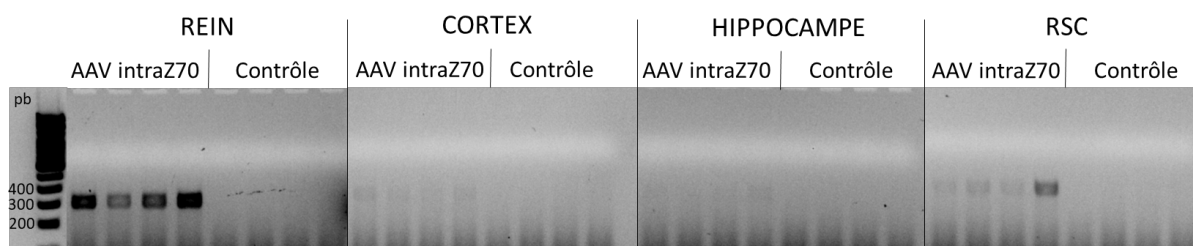


Figure 48: Biodistribution du transgène après injection intraveineuse d'AAV2/9

Un mois après l'injection de l'AAV2/9 exprimant l'intraZ70 à 5.10^{11} vg/mL ou le tampon de dilution PBS/ Acide pluronique 0,001% comme contrôle, les animaux sont sacrifiés et différents organes prélevés. Une RT-PCR de la séquence de la mCherry a été réalisée sur du tissu de rein, de cortex, de l'hippocampe ou des régions sous corticales (RSC). Un indicateur de taille en paire de base (pb) permet de visualiser la taille attendue de l'amplicon.

Une optimisation de la délivrance des vecteurs viraux vers le cerveau peut être réalisée par injection intraveineuse par voie rétro-orbitale ou par administration intra-nasale, méthodes peu invasives ayant déjà permis la diffusion de vecteurs AAV vers le SNC (Gruntman et al., 2017; Ye et al., 2024).

En études pré-cliniques, les sérotypes d'AAV de type PHP sont régulièrement utilisés pour un tropisme vers le SNC. L'amélioration du passage de la BHE de vecteur AAV.PHP chez les rongeurs est liée à l'interaction de la capside avec le récepteur LY6A situé sur les cellules endothéliales de la BHE (Batista et al., 2020; Q. Huang et al., 2019). Cependant les primates ne possèdent pas d'homologues de LY6A, il est donc nécessaire pour une application clinique d'optimiser les capsides pour cibler d'autres protéines LY6 présentes sur l'endothélium du SNC et ayant des homologues chez l'homme. De nouvelles capsides sont ainsi en cours de développement pour l'optimisation du passage de la BHE par les AAVs chez les primates (X. Chen et al., 2023; Goertsen et al., 2022).

1.2. Passage de la BHE par les VHHs

Grâce à leur petite taille et portant plutôt des charges positives, les VHHs peuvent passer la BHE par la voie d'endocytose plus efficacement que les anticorps conventionnels. Cependant le point isoélectrique attendu de l'intraZ70 est de 4,6. En effet, les modifications structurales ou la fusion avec des peptides impactent leur charge et leur potentiel de fusion avec la membrane plasmique (Rutgers et al., 2011). Dans ce contexte, certaines stratégies de fusion d'un nanocorps avec des récepteurs-pouvant médier leur transfert par la BHE sont en cours de développement, utilisant par exemple le récepteur des lipoprotéines à basse densité, le récepteur de l'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor-1) ou

le récepteur à la transferrine (TfR). Un VHH ciblant le TfR a permis de délivrer dans le cerveau la neurotensine, un peptide ne pouvant pas attendre le SNC depuis la périphérie (Wouters et al., 2020). Par la suite, ce VHH a permis de faire pénétrer un Fab dans le cerveau de souris transgéniques et de diminuer la pathologie amyloïde (Wouters et al., 2022), prouvant que les VHHs ciblant le TfR peuvent améliorer l'efficacité de délivrance de molécules dans le SNC. De la même manière, un nanocorps dirigé contre le récepteur de l'IGF-1 a permis la délivrance de neurotensine dans le SNC (Alata et al., 2022; Yogi et al., 2022). Le VHH WIW dirigé contre la protéine tau et associé à un VHH ciblant le récepteur IGF-1 a été retrouvé dans le cerveau trente minutes après injection périphérique (Abskharon et al., 2023). Néanmoins, pour un ciblage efficace de l'intraTau, le VHH doit nécessairement entrer dans les cellules après passage de la BHE. L'addition de peptide de pénétration des cellules (CPP pour Cell Penetrating Peptide) au VHH est une des stratégies développées pour le passage de la membrane plasmique par des nanocorps. La combinaison de CPP et de nanoparticules lipidiques a par ailleurs permis un passage de la BHE et la délivrance d'un siRNA dans des cellules de gliome après une injection intra-nasale chez le rat (Kanazawa et al., 2014).

2. Activité des VHHs Z70

2.1. Innocuité des intra et extraZ70

L'hexapeptide PHF6 est impliqué dans la formation des feuilletts β -plissés des PHFs (von Bergen et al., 2000), et est retrouvé dans les structures des fibres dans l'ensemble des tauopathies (Shi et al., 2021), dans le LCS (Barthélemy, Gabelle, et al., 2016) et dans des vésicules extracellulaires issues de fluide interstitiel (Oosterlynck et al., 2025, en révision) de patients atteints de MA. Le ciblage de cet épitope présente un intérêt thérapeutique. Cependant, sa présence sur la protéine tau physiologique, qui remplit de nombreuses fonctions cellulaires, pose la question des effets indésirables liés à son ciblage. La stabilité de la quantité de protéine tau dans l'hippocampe des souris des groupes intra et extraZ70 par rapport au groupe contrôle (Figure 34a) suggère une absence de dégradation de la protéine physiologique. Les effets observés en imagerie IRM ne traduisent pas non plus de dommages neuronaux ou à la myéline, enfin nous n'avons pas observé d'activation de stress intracellulaire, ni de variation de la quantité des astrocytes (Figure 31, 33 et 34). L'activation de la microglie pour l'extraZ70 était attendue car elle peut être bénéfique. En effet, certaines études montrent que la clairance du complexe formé par la protéine tau et son anticorps implique les récepteurs Fc de la microglie (Andersson et al., 2019; Funk et al., 2015). De manière intéressante, une augmentation de l'expression de tous les sous-types de récepteurs Fc est observée à la surface des cellules microgliales de patients

atteints de MA (Fuller et al., 2014). L'augmentation de la microglie dans le groupe intraZ70 est quant à elle plus surprenante. Celle-ci est peut être corrélée aux variations observées en études DTI bien que ces changements restent faibles comparés à des modèles de lésions axonales ou de tauopathies (Donald et al., 2007; H. E. Holmes et al., 2016). De plus, l'absence d'augmentation du métabolisme du glucose suggèrent un état cérébral sans inflammation.

2.2. Les modèles de tauopathies

Le modèle murin de souris Tg30 nous a permis d'étudier l'effet des intra et extraZ70 sur un modèle chronique de pathologie. La distribution anatomique de la pathologie, sa cinétique d'apparition et les troubles associés en font un bon modèle de tauopathie. Cependant, l'effet limité sur la pathologie tau cinq ou neuf mois après l'injection des vecteurs viraux est peut-être dû à la forte surexpression de la protéine tau humaine mutée. En effet, 10 copies de l'ADN transgénique sont détectées dans ces animaux, ce qui ne permet pas de reproduire une expression normale de la protéine tau (Schindowski et al., 2006). Les souris 'knock-in' (KI) sont un modèle dans lequel le gène murin *MAPT* a été remplacé par le gène *MAPT* humain, toujours sous le contrôle du promoteur murin. Ces animaux expriment la protéine tau à un niveau physiologique et sans co-expression avec le gène *MAPT* murin endogène. Les premiers modèles ne présentaient pas de protéine tau pathologique ni de phénotypes associés (T. Saito et al., 2019). Mais récemment, les souris KI *MAPT* avec mutations P301L et S320F ont présenté des troubles cognitifs et des lésions tau à 12 mois (Morito et al., 2025). Bien qu'ayant un développement de la pathologie plus long, l'étude de l'effet de l'intraZ70 dans ce type de modèle serait intéressante. Cependant comme pour la souris Tg30, ces modèles expriment la protéine tau mutée, ne modélisant pas la physiopathologie de la grande majorité des tauopathies.

Pour le ciblage de la protéine tau dans le compartiment extracellulaire, le modèle de nucléation *in vivo* du laboratoire a permis d'évaluer les capacités de l'extraZ70 sur un temps court, les animaux étant sacrifiés à 2,5 mois (Albert et al., 2019; Danis et al., 2022). D'autres modèles murins d'étude de la propagation existent. Les souris rTgTauEC sont un des rares modèles transgéniques reproduisant ce phénomène. Elles expriment la protéine tau mutée dans des neurones du cortex entorhinal qui se propagent avec l'âge dans les régions anatomiquement connectées, notamment l'hippocampe (de Calignon et al., 2012). Pourtant, ce modèle présente très peu d'altérations cognitives et la pathologie tau n'est visible qu'à partir de 16 mois dans le cortex entorhinal, rendant difficile l'étude d'un effet thérapeutique (Harris et al., 2012; Polydoro et al., 2014). La grande majorité des modèles d'étude de la propagation de la protéine tau est basée sur des injections intracérébrales de matériel pro-nucléant (protéine tau recombinante sous forme oligomérique ou fibrillaire, homogénat ou PHFs

dérivés de cerveau de patients ou de modèles murins) (Z. Ahmed et al., 2014; Audouard et al., 2016; Boluda et al., 2015; Clavaguera et al., 2009; Hosokawa et al., 2022; Hu et al., 2016; Peeraer et al., 2015; Stancu et al., 2015) à l'instar du modèle utilisé dans cette étude. Plus récemment, l'étude des mécanismes de nucléation et de propagation a également été réalisée chez les primates non-humains, par injection de matériel pro-nucléant dans le cerveau de microcèbe (Gary et al., 2019; Lam et al., 2021) ou de macaque (Darricau et al., 2023). Ces derniers ont une homologie phylogénétique et une anatomie cérébrale plus proches de l'humain que les rongeurs et permettent des études comportementales et de connectivité plus poussées. De plus, des PHFs ont été retrouvés dans le cortex entorhinal et préfrontal de macaques âgés de plus de 30 ans (Paspalas et al., 2018). Avec les chimpanzés, les macaques sont les seuls animaux non-humains à développer spontanément des PHFs avec le vieillissement.

Cependant, l'apport de matériel pro-nucléant par injection dans les différents modèles murins ne reproduit pas la sécrétion par la cellule donneuse. La modélisation par injection de vecteurs viraux surexprimant la protéine tau dans une région cérébrale permet de reproduire le passage de cellule à cellule, les lésions tau se propageant à des neurones connectés à la zone d'injection. Cette méthodologie a été réalisée chez le rongeur (Caillierez et al., 2013; Dujardin et al., 2018; Wegmann et al., 2017). Une étude a également reproduit la propagation de la protéine tau et sa présence dans le LCS chez le macaque suite à une injection de vecteurs viraux AAV exprimant la protéine tau humaine mutée (Beckman et al., 2021, 2024). Dans ce type de modèle, l'expression des VHHs extra ou intraZ70 dans les régions connectées au site de surexpression de protéine tau permettrait de valider leur effet sur la propagation dans le liquide interstitiel comme sur la nucléation intracellulaire.

2.3. Efficacité thérapeutique du Z70

L'étude de l'efficacité des intra et extraZ70 dans un modèle chronique nous a permis de montrer un effet bénéfique des deux constructions sur le phénotype associé à la pathologie tau. Ainsi, une amélioration du volume cérébral et du comportement des animaux sont observés (Figures 35 et 36). Ce dernier résultat mériterait d'être confirmé par différentes épreuves étudiant les mêmes fonctions. Les résultats de labyrinthe à champ ouvert pourrait être complétés par d'autres mesures de l'anxiété ayant une implication de l'hippocampe comme le labyrinthe en croix surélevé, le test d'enfouissement des billes ou le test de la boîte claire-obscur (Deacon et al., 2002; Deacon & Rawlins, 2005; Gould, 2009). Pour l'étude de la mémoire spatiale, l'effet observé dans le test du labyrinthe en Y était modeste, ainsi d'autres tests de mémoire permettraient d'appuyer ces résultats. Par exemple, le test de la reconnaissance d'objet font aussi intervenir l'hippocampe dorsal et serait pertinent pour

compléter cette étude. La piscine de Morris fait intervenir le même type de mémoire mais impose une vérification des fonctions motrices de nage du modèle Tg30 (Bannerman et al., 2012; Cohen & Stackman, 2015; Othman et al., 2022).

Également dans le modèle chronique, l'effet de l'intraZ70 sur les lésions tau n'a été observé qu'avec l'anticorps AT8 par analyse anatomopathologique des coupes de cerveau de souris (Figure 38). Cet anticorps est une référence pour déterminer les stades de la pathologie post-mortem et reconnaît l'hyperphosphorylation de la protéine tau (Goedert et al., 1995; Malia et al., 2016). Ce phénomène est un marqueur de la pathologie observée avant le changement de conformation de la protéine tau, détecté par l'anticorps MC1, ou la phosphorylation sur des sites pathologiques, détecté par l'anticorps AT100 (Islam et al., 2025; Neddens et al., 2018). Dans notre étude, malgré l'absence de réduction de l'immunomarquage MC1 et AT100 et des agrégats insolubles de protéine tau (Figures 40 et 41), un effet bénéfique a été observé sur plusieurs critères d'évaluation du phénotype des souris Tg30 des groupes Z70. L'intraZ70 s'engageant bien sur sa cible, positive à l'immunomarquage AT8 (Figure 39c), il est probable qu'il se lie aux formes précédant les agrégats, soit les espèces oligomériques de protéine tau. Bien que les PHFs soient considérés comme les indicateurs de la pathologie, les formes oligomériques de protéine tau semblent être un élément clé dans le développement des lésions tau. Elles présentent une toxicité sur de nombreuses fonctions intracellulaires comme l'expression de certains gènes (Benhelli-Mokrani et al., 2018), le fonctionnement de la mitochondrie (Camilleri et al., 2020; Lasagna-Reeves et al., 2011; Zheng et al., 2020), la plasticité synaptique (Fá et al., 2016; Hill et al., 2019; Lasagna-Reeves et al., 2011), l'assemblage des microtubules (Makrides et al., 2003) et le transport axonal (Cox et al., 2016; Tiernan et al., 2016). Dans des modèles murins, l'injection intracrâniale d'oligomères de protéine tau déclenche une propagation plus importante des lésions tau aux régions connectées par rapport aux PHFs (Lasagna-Reeves et al., 2012; Mate De Gerando et al., 2023). Ainsi l'action de l'intraZ70 uniquement sur les oligomères, formes précoces des PHFs, pourrait ralentir la toxicité de la pathologie. Une analyse de la présence des oligomères dans les modèles utilisés permettrait d'étudier cette hypothèse.

D'autres sites d'hyperphosphorylation, les résidus sérine 199 et sérine 396, ont été étudiés par analyse biochimique du lysat d'hippocampe mais aucun effet bénéfique de l'intraZ70 n'a été visualisé (Figure 41). Cette méthode permet d'observer toutes les protéines solubles, oligomériques et agrégées. L'analyse immunohistochimique permet une étude restreinte aux zones présentant une accumulation de protéine tau et démontre une diminution de la surface de l'immunomarquage AT8. Ainsi l'ensemble des résultats indique que l'intraZ70 cible les formes précoces des PHFs. Cependant, cet effet ne bloque pas la formation des PHFs insolubles.

3. Perspectives :

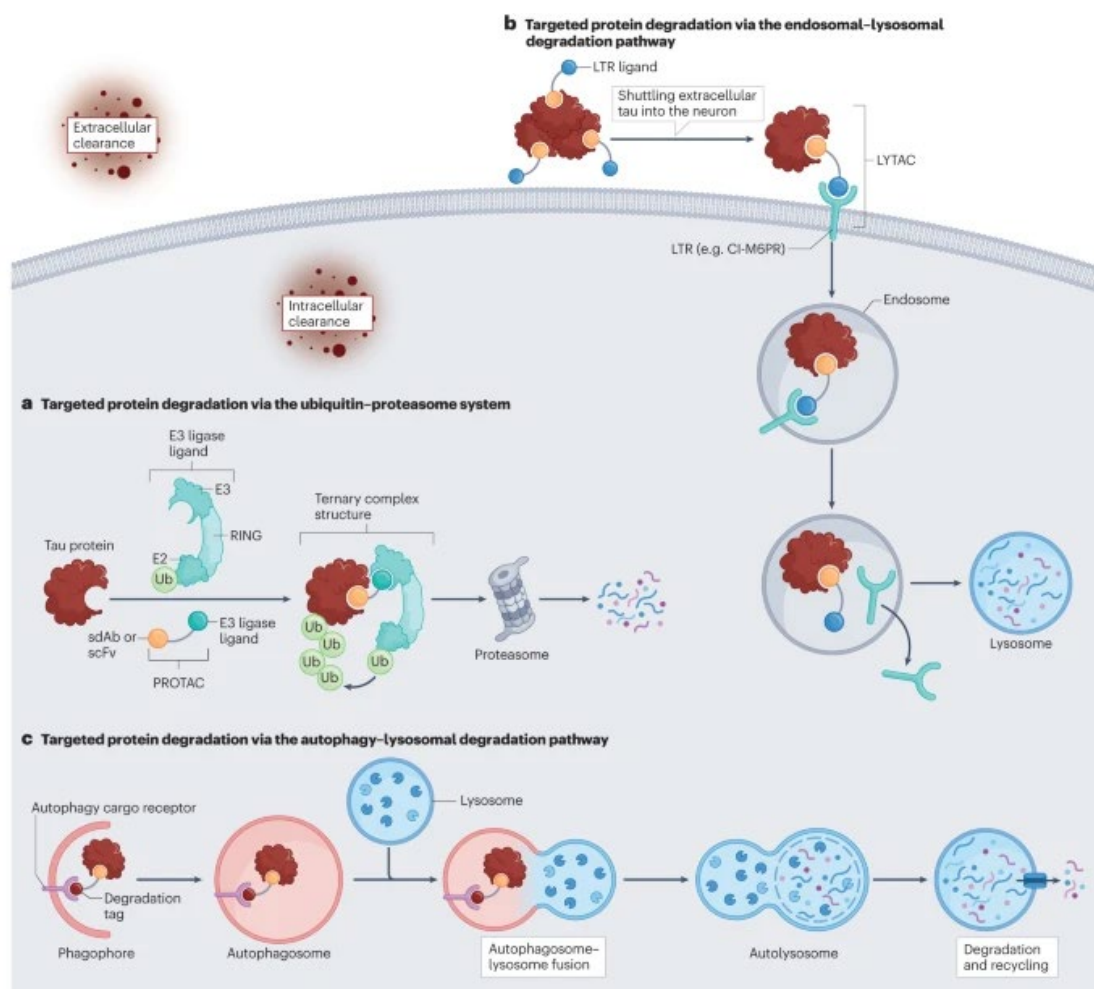
L'intraZ70 s'engage bien sur sa cible mais ne semble pas avoir d'effet sur la formation de fibres, ni sur la dégradation de la protéine tau physiologique ou pathologique. Alors que nos VHHs Z70 présentent bien un impact sur les conséquences de la toxicité des lésions tau, l'absence de diminution des PHFs matures reste un problème. Il est possible que le VHH lié à la protéine tau ne soit pas reconnu comme problématique pour la cellule et n'enclenche aucun mécanisme de prise en charge de dégradation cellulaire. La combinaison des VHHs avec des molécules chimères ciblant différentes voies de dégradation est une perspective pour pallier à cette difficulté.

3.1. *Stratégies de dégradation de la cible :*

Il existe différentes possibilités pour cibler les protéines intracellulaires et les diriger vers les systèmes de dégradation cellulaire (Figure 49). Les chimères ciblant la protéolyse (PROTAC) sont des complexes hétéro-bivalent constitués d'un ligand de la protéine d'intérêt relié à un ligand de l'ubiquitine ligase E3 par une liaison courte. Ce complexe ainsi formé permet l'ubiquitinylation de la protéine cible et sa dégradation par le protéasome. Dans des modèles murins de pathologie tau, des systèmes PROTAC avec des peptides ou des petites molécules ciblant la protéine tau ont induit une réduction des niveaux de protéine tau totale et phosphorylée et l'amélioration des performances cognitives (Gong et al., 2024; W. Wang et al., 2021; Yao et al., 2024). Plusieurs études ont utilisé un VHH comme ligand dans un système PROTAC pour une dégradation efficace de différentes protéines intracellulaires (Ibrahim et al., 2020; Lim et al., 2020). L'équipe du Dr McEwans a combiné un VHH anti-tau développé par l'équipe d'Isabelle Landrieu, le F8-2 dirigé contre la partie carboxy-terminale de la protéine tau, avec comme ubiquitine ligase E3, le domaine RING de TRIM21. Celui-ci est ubiquitinylé uniquement après sa dimérisation, nécessitant deux protéines cibles proches (Miller et al., 2024). Dans le cas de la protéine tau, cela permet donc la reconnaissance de protéines dimériques, oligomériques ou agrégées et de ne pas éliminer les monomères. Ce système a permis une diminution significative de plusieurs paramètres de la pathologie tau dans un modèle murin : quantité de protéine tau hyperphosphorylée, pathologique, insoluble et pro-nucléantes (Benn et al., 2024).

Les constructions de chimères ciblant l'autophagie (AUTAC) permettent d'adresser la protéine d'intérêt à la voie de l'autophagie. Ce sont également des complexes hétéro-bivalents constitués d'un ligand de la protéine d'intérêt relié par une liaison courte à un ligand d'adressage à l'autophagie. Cette

Il existe également des systèmes chimériques induisant la dégradation de protéines extracellulaires par les lysosomes nommés LYTAG. Le complexe est toujours formé d'un ligand de la protéine d'intérêt mais l'autre partie est un ligand des récepteurs de type mannose-6-phosphate qui permettent une entrée du complexe par endocytose puis un ciblage vers les lysosomes et ainsi une dégradation de la protéine cible.



(a) Les chimères PROTAC comprennent une molécule se liant à la cible intracellulaire, un lien court et une molécule recrutant l'ubiquitine ligase E3. Le complexe ainsi formé permet la dégradation de la cible (ici la protéine tau) par le protéasome via le système ubiquitine. **(b)** Dans le système LYTAC, un ligand du récepteur aux lysosomes (LTR) amène la cible extracellulaire à l'intérieur des cellules pour une dégradation via les lysosomes. **(c)** Avec l'AUTAC (autophagy-targeting chimera), un ligand dérivé de la guanidine ou se liant à la protéine p62 adresse la protéine cible intracellulaire à la voie de l'autophagie via les lysosomes (Congdon et al., 2023).

3.2. Amélioration de la stabilité du Z70 :

L'ensemble des travaux réalisés sur le VHH Z70 sans protéine rapportrice soulève la question d'un problème de stabilité. Celui-ci n'est efficace qu'avec une protéine rapportrice, la mCherry (Figure 46) et n'est pas détecté suite à son expression *in vitro* et *in vivo* (Figures 45 et 47). Plusieurs pistes d'optimisation sont envisagées au sein de nos laboratoires afin de pallier à ce problème.

Les nanocorps bivalents, aussi appelés diabodies, sont constitués de deux VHHs reliés par un lien de quelques acides aminés. Cette configuration augmente la stabilité, l'affinité et la sélectivité des VHHs (Coppieters et al., 2006; C. Li et al., 2022; Van Roy et al., 2015). Un autre VHH du laboratoire ciblant l'épitope PHF6* de la protéine tau est en cours de développement. L'hexapeptide PHF6*_{275VQIINK₂₈₀}, comme le PHF6, est impliqué dans la formation des fibres de protéine tau (von Bergen et al., 2001). Sa position sur le deuxième domaine de liaison aux microtubules est en amont du PHF6, assez proche pour la taille d'un diabody mais assez éloigné pour éviter un chevauchement des épitopes (Figure 50). La combinaison du VHH anti-PHF6* avec le VHH Z70 permettrait d'améliorer la stabilité de ce dernier mais également l'affinité et l'efficacité.

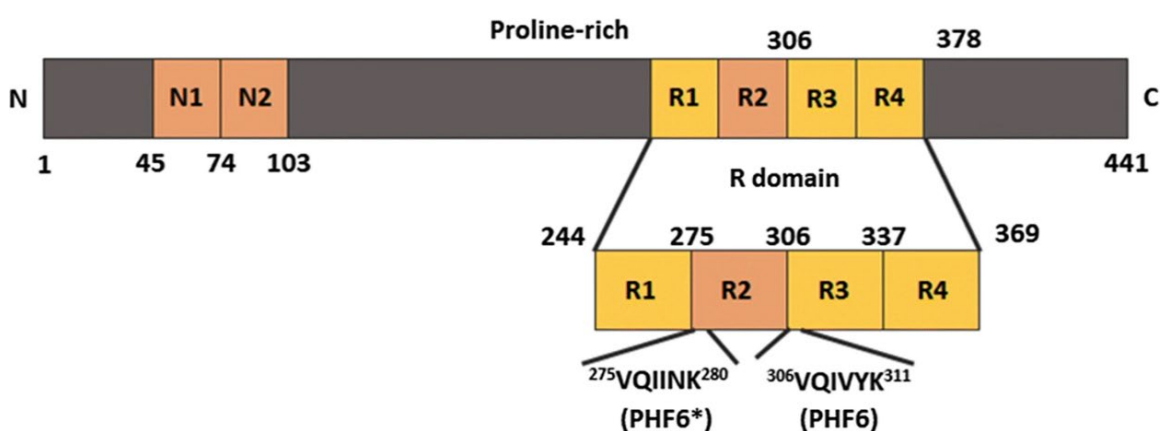


Figure 50: Localisation des hexapeptides PHF6* et PHF6 sur la protéine tau 2N4R (Viswanathan et al., 2020)

Malgré les nombreuses similarités des VHHs avec les VHs humains, leur origine non humaine a favorisé l'hypothèse qu'ils pourraient augmenter le risque d'une réponse immunitaire indésirable suite à leur administration. L'humanisation est une stratégie de réduction de l'immunogénicité basée sur le remplacement de plusieurs séquences des VHHs de camélidés par des séquences humaines. Le VHH Z70 est un VHH humanisé. Il est issu d'une optimisation du E4-1, lui-même sélectionné sur une banque synthétique de VHHs humanisés par plusieurs mutations dans les FR pour se rapprocher des séquences

des FR des VH humains (A14P, A49S, A76S, K88R, P89A) (Moutel et al., 2016). Bien que les quatre résidus impliqués dans la solubilité des VHHs de camélidés aient été conservés dans cette librairie, certaines études démontrent que l'humanisation affecte la solubilité et la stabilité des VHHs (Kinoshita et al., 2022; Vincke et al., 2009). De plus, le recul sur les essais cliniques utilisant des VHHs de camélidés ou humanisés, ne met pas en évidence un bénéfice des VHHs humanisés sur l'immunogénicité du traitement (Rossotti et al., 2022). Ainsi, un projet étudiant les propriétés des VHHs du laboratoire 'déshumanisés' est en cours de développement.

CONCLUSION

Ce projet de thèse a permis de modéliser pour la première fois l'expression *in vivo* d'un VHH ciblant la protéine tau à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. C'est également la première étude de l'innocuité d'un ciblage de la protéine tau par un nanocorps. Nos deux constructions se sont montrées sûres sur la grande majorité des critères d'évaluation, rendant légitime l'étude de leur efficacité sur la pathologie. Ainsi, l'intra et l'extraZ70 ont présenté des capacités de réduction des lésions tau dans des modèles chroniques ou aigus. Les deux peuvent également réduire les effets toxiques de la pathologie comme l'atrophie cérébrale ou les troubles comportementaux. Leur optimisation permettra d'améliorer leur performance contre la pathologie et ses conséquences dans l'espoir d'un développement de thérapeutique contre les tauopathies.

BIBLIOGRAPHIE

- Abadin, X., de Dios, C., Zubillaga, M., Ivars, E., Puigròs, M., Marí, M., Morales, A., Vizuete, M., Vitorica, J., Trullas, R., Colell, A., & Roca-Agujetas, V. (2024). Neuroinflammation in Age-Related Neurodegenerative Diseases : Role of Mitochondrial Oxidative Stress. *Antioxidants*, 13(12), 1440. <https://doi.org/10.3390/antiox13121440>
- Abounit, S., Wu, J. W., Duff, K., Victoria, G. S., & Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes : A possible highway in the spreading of tau and other prion-like proteins in neurodegenerative diseases. *Prion*, 10(5), 344-351. <https://doi.org/10.1080/19336896.2016.1223003>
- Abshkharon, R., Pan, H., Sawaya, M. R., Seidler, P. M., Olivares, E. J., Chen, Y., Murray, K. A., Zhang, J., Lantz, C., Bentzel, M., Boyer, D. R., Cascio, D., Nguyen, B. A., Hou, K., Cheng, X., Pardon, E., Williams, C. K., Nana, A. L., Vinters, H. V., ... Eisenberg, D. S. (2023). Structure-based design of nanobodies that inhibit seeding of Alzheimer's patient-extracted tau fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(41), e2300258120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2300258120>
- Agrawal, V., Slivac, I., Perret, S., Bisson, L., St-Laurent, G., Murad, Y., Zhang, J., & Durocher, Y. (2012). Stable Expression of Chimeric Heavy Chain Antibodies in CHO Cells. In *Single Domain Antibodies* (p. 287-303). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_18
- Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Blum, D., Galas, M.-C., D'Hooge, R., Buee, L., & Balschun, D. (2014). Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiology of Aging*, 35(11), 2474-2478. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005>
- Ahmed, Z., Cooper, J., Murray, T. K., Garn, K., McNaughton, E., Clarke, H., Parhizkar, S., Ward, M. A., Cavallini, A., Jackson, S., Bose, S., Clavaguera, F., Tolnay, M., Lavenir, I., Goedert, M., Hutton, M. L., & O'Neill, M. J. (2014). A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: The pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathologica*, 127(5), 667-683. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1254-6>
- Alata, W., Yogi, A., Brunette, E., Delaney, C. E., van Faassen, H., Hussack, G., Iqbal, U., Kemmerich, K., Haqqani, A. S., Moreno, M. J., & Stanimirovic, D. B. (2022). Targeting insulin-like growth factor-1 receptor (IGF1R) for brain delivery of biologics. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 36(3), e22208. <https://doi.org/10.1096/fj.202101644R>
- Albert, M., Mairet-Coello, G., Danis, C., Lieger, S., Caillierez, R., Carrier, S., Skrobala, E., Landrieu, I., Michel, A., Schmitt, M., Citron, M., Downey, P., Courade, J.-P., Buée, L., & Colin, M. (2019). Prevention of tau seeding and propagation by immunotherapy with a central tau epitope antibody. *Brain*, 142(6), 1736-1750. <https://doi.org/10.1093/brain/awz100>
- Alirezaei, Z., Pourhanifeh, M. H., Borran, S., Nejati, M., Mirzaei, H., & Hamblin, M. R. (2020). Neurofilament light chain as a biomarker, and correlation with magnetic resonance imaging in diagnosis of CNS-related disorders. *Molecular neurobiology*, 57(1), 469-491. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01698-3>

- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, « Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde ». *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 8(6), 429-431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Amadoro, G., Corsetti, V., Sancesario, G. M., Lubrano, A., Melchiorri, G., Bernardini, S., Calissano, P., & Sancesario, G. (2014). Cerebrospinal fluid levels of a 20-22 kDa NH2 fragment of human tau provide a novel neuronal injury biomarker in Alzheimer's disease and other dementias. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 42(1), 211-226. <https://doi.org/10.3233/JAD-140267>
- Andersson, C. R., Falsig, J., Stavenhagen, J. B., Christensen, S., Kartberg, F., Rosenqvist, N., Finsen, B., & Pedersen, J. T. (2019). Antibody-mediated clearance of tau in primary mouse microglial cultures requires Fcγ-receptor binding and functional lysosomes. *Scientific Reports*, 9(1), 4658. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41105-4>
- Ando, K., Houben, S., Homa, M., De Fisenne, M.-A., Potier, M.-C., Erneux, C., Brion, J.-P., & Leroy, K. (2021). Alzheimer's Disease : Tau Pathology and Dysfunction of Endocytosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13, 583755. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.583755>
- Antón-Fernández, A., Vallés-Saiz, L., Avila, J., & Hernández, F. (2023). Neuronal nuclear tau and neurodegeneration. *Neuroscience*, 518, 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.07.015>
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., & Oda, T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), 602-611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.093>
- 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 Letters*, 414(3), 521-526. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(97\)01062-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(97)01062-4)
- Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., & MacKenzie, R. (2005). Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Reviews*, 24(4), 501-519. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-6193-1>
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., & Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(3 Pt 1), 631-639. <https://doi.org/10.1212/wnl.42.3.631>
- 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. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(34), 9115-9129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>
- Audouard, E., Houben, S., Masaracchia, C., Yilmaz, Z., Suain, V., Authélet, M., De Decker, R., Buée, L., Boom, A., Leroy, K., Ando, K., & Brion, J.-P. (2016). High-Molecular-Weight Paired Helical Filaments from Alzheimer Brain Induces Seeding of Wild-Type Mouse Tau into an Argyrophilic 4R Tau Pathology in Vivo. *The American Journal of Pathology*, 186(10), 2709-2722. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.008>
- Aung, W. Y., Mar, S., & Benzinger, T. L. (2013). Diffusion tensor MRI as a biomarker in axonal and myelin damage. *Imaging in Medicine*, 5(5), 427-440. <https://doi.org/10.2217/iim.13.49>

- Bacioglu, M., Maia, L. F., Preische, O., Schelle, J., Apel, A., Kaeser, S. A., Schweighauser, M., Eninger, T., Lambert, M., Pilotto, A., Shimshek, D. R., Neumann, U., Kahle, P. J., Staufenbiel, M., Neumann, M., Maetzler, W., Kuhle, J., & Jucker, M. (2016). Neurofilament Light Chain in Blood and CSF as Marker of Disease Progression in Mouse Models and in Neurodegenerative Diseases. *Neuron*, 91(1), 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.018>
- Bai, J., Trinh, T. L. H., Chuang, K.-H., & Qiu, A. (2012). Atlas-based automatic mouse brain image segmentation revisited : Model complexity vs. image registration. *Magnetic Resonance Imaging*, 30(6), 789-798. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.02.010>
- Baker, S., Polanco, J. C., & Götz, J. (2016). Extracellular Vesicles Containing P301L Mutant Tau Accelerate Pathological Tau Phosphorylation and Oligomer Formation but Do Not Seed Mature Neurofibrillary Tangles in ALZ17 Mice. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 54(3), 1207-1217. <https://doi.org/10.3233/JAD-160371>
- Banka, V., Kelleher, A., Sehlin, D., Hultqvist, G., Sigurdsson, E. M., Syvänen, S., & Ding, Y.-S. (2023). Development of brain-penetrable antibody radioligands for in vivo PET imaging of amyloid- β and tau. *Frontiers in Nuclear Medicine*, 3, 1173693. <https://doi.org/10.3389/fnume.2023.1173693>
- Bannerman, D. M., Bus, T., Taylor, A., Sanderson, D. J., Schwarz, I., Jensen, V., Hvalby, Ø., Rawlins, J. N. P., Seeburg, P. H., & Sprengel, R. (2012). Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nature Neuroscience*, 15(8), 1153-1159. <https://doi.org/10.1038/nn.3166>
- Barini, E., Plotzky, G., Mordashova, Y., Hoppe, J., Rodriguez-Correa, E., Julier, S., LePrieult, F., Mairhofer, I., Mezler, M., Biesinger, S., Cik, M., Meinhardt, M. W., Ercan-Herbst, E., Ehrnhoefer, D. E., Striebinger, A., Bodie, K., Klein, C., Gasparini, L., & Schlegel, K. (2022). Tau in the brain interstitial fluid is fragmented and seeding-competent. *Neurobiology of Aging*, 109, 64-77. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.09.013>
- Barthélemy, N. R., Fenaille, F., Hirtz, C., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Vialaret, J., Buée, L., Gabelle, A., Junot, C., Lehmann, S., & Becher, F. (2016). Tau Protein Quantification in Human Cerebrospinal Fluid by Targeted Mass Spectrometry at High Sequence Coverage Provides Insights into Its Primary Structure Heterogeneity. *Journal of Proteome Research*, 15(2), 667-676. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01001>
- Barthélemy, N. R., Gabelle, A., Hirtz, C., Fenaille, F., Sergeant, N., Schraen-Maschke, S., Vialaret, J., Buée, L., Junot, C., Becher, F., & Lehmann, S. (2016). Differential Mass Spectrometry Profiles of Tau Protein in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer's Disease, Progressive Supranuclear Palsy, and Dementia with Lewy Bodies. *Journal of Alzheimer's Disease*, 51(4), 1033-1043. <https://doi.org/10.3233/JAD-150962>
- Batista, A. R., King, O. D., Reardon, C. P., Davis, C., Shankaracharya, null, Philip, V., Gray-Edwards, H., Aronin, N., Lutz, C., Landers, J., & Sena-Esteves, M. (2020). Ly6a Differential Expression in Blood-Brain Barrier Is Responsible for Strain Specific Central Nervous System Transduction Profile of AAV-PHP.B. *Human Gene Therapy*, 31(1-2), 90-102. <https://doi.org/10.1089/hum.2019.186>
- Beckman, D., Chakrabarty, P., Ott, S., Dao, A., Zhou, E., Janssen, W. G., Donis-Cox, K., Muller, S., Kordower, J. H., & Morrison, J. H. (2021). A novel tau-based rhesus monkey model of Alzheimer's pathogenesis. *Alzheimer's & Dementia*, 17(6), 933-945. <https://doi.org/10.1002/alz.12318>

- Beckman, D., Diniz, G. B., Ott, S., Hobson, B., Chaudhari, A. J., Muller, S., Chu, Y., Takano, A., Schwarz, A. J., Yeh, C.-L., McQuade, P., Chakrabarty, P., Kanaan, N. M., Quinton, M. S., Simen, A. A., Kordower, J. H., & Morrison, J. H. (2024). Temporal progression of tau pathology and neuroinflammation in a rhesus monkey model of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 20(8), 5198-5219. <https://doi.org/10.1002/alz.13868>
- Belur, L. R., Romero, M., Lee, J., Podetz-Pedersen, K. M., Nan, Z., Riedl, M. S., Vulchanova, L., Kitto, K. F., Fairbanks, C. A., Kozarsky, K. F., Orchard, P. J., Frey, W. H., Low, W. C., & McIvor, R. S. (2021). Comparative Effectiveness of Intracerebroventricular, Intrathecal, and Intranasal Routes of AAV9 Vector Administration for Genetic Therapy of Neurologic Disease in Murine Mucopolysaccharidosis Type I. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.618360>
- Benhelli-Mokrani, H., Mansuroglu, Z., Chauderlier, A., Albaud, B., Gentien, D., Sommer, S., Schirmer, C., Laqueuvre, L., Josse, T., Buée, L., Lefebvre, B., Galas, M.-C., Souès, S., & Bonnefoy, E. (2018). Genome-wide identification of genic and intergenic neuronal DNA regions bound by Tau protein under physiological and stress conditions. *Nucleic Acids Research*, 46(21), 11405-11422. <https://doi.org/10.1093/nar/gky929>
- Benn, J., Cheng, S., Keeling, S., Smith, A. E., Vaysburd, M. J., Böken, D., Miller, L. V. C., Katsinelos, T., Franco, C., Dupré, E., Danis, C., Landrieu, I., Buée, L., Klenerman, D., James, L. C., & McEwan, W. A. (2024). Aggregate-selective removal of pathological tau by clustering-activated degraders. *Science (New York, N.Y.)*, 385(6712), 1009-1016. <https://doi.org/10.1126/science.adp5186>
- Bergman, I., Burckart, G. J., Pohl, C. R., Venkataramanan, R., Barmada, M. A., Griffin, J. A., & Cheung, N. K. (1998). Pharmacokinetics of IgG and IgM anti-ganglioside antibodies in rats and monkeys after intrathecal administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284(1), 111-115.
- Bijttebier, S., Theunis, C., Jahouh, F., Martins, D. R., Verhemeldonck, M., Grauwen, K., Dillen, L., & Mercken, M. (2021). Development of immunoprecipitation—Two-dimensional liquid chromatography—Mass spectrometry methodology as biomarker read-out to quantify phosphorylated tau in cerebrospinal fluid from Alzheimer disease patients. *Journal of Chromatography. A*, 1651, 462299. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462299>
- Binder, L. I., Frankfurter, A., & Rebhun, L. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology*, 101(4), 1371-1378.
- Boluda, S., Iba, M., Zhang, B., Raible, K. M., Lee, V. M.-Y., & Trojanowski, J. Q. (2015). Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains. *Acta Neuropathologica*, 129(2), 221-237. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>
- Boyarko, B., & Hook, V. (2021). Human Tau Isoforms and Proteolysis for Production of Toxic Tau Fragments in Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 702788. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.702788>
- Boyne, L. J., Tessler, A., Murray, M., & Fischer, I. (1995). Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 358(2), 279-293. <https://doi.org/10.1002/cne.903580209>

- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239-259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braak, H., Braak, E., & Strothjohann, M. (1994). Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat. *Neuroscience Letters*, 171(1), 1-4. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90589-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90589-4)
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathologica*, 121(2), 171-181. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0789-4>
- Brady, R. M., Zinkowski, R. P., & Binder, L. I. (1995). Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiology of Aging*, 16(3), 479-486. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00023-8](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00023-8)
- Brandt, R., Léger, J., & Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *The Journal of Cell Biology*, 131(5), 1327-1340.
- Brendel, M., Schönecker, S., Höglinger, G., Lindner, S., Havla, J., Blautzik, J., Sauerbeck, J., Rohrer, G., Zach, C., Vettermann, F., Lang, A. E., Golbe, L., Nübling, G., Bartenstein, P., Furukawa, K., Ishiki, A., Bötzel, K., Danek, A., Okamura, N., ... Rominger, A. (2018). [18F]-THK5351 PET Correlates with Topology and Symptom Severity in Progressive Supranuclear Palsy. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2017.00440>
- Brion, J.-P., Passareiro, H., Nunez, J., & Flament-Durand, J. (1985). Mise en évidence Immunologique de la protéine Tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch. Biol. Bruxelles*, 95, 229-235.
- Buchholz, S., & Zempel, H. (2024). The six brain-specific TAU isoforms and their role in Alzheimer's disease and related neurodegenerative dementia syndromes. *Alzheimer's & Dementia*, 20(5), 3606-3628. <https://doi.org/10.1002/alz.13784>
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., & Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*.
- Buée, L., & Delacourte, A. (1999). Comparative Biochemistry of Tau in Progressive Supranuclear Palsy, Corticobasal Degeneration, FTDP-17 and Pick's Disease. *Brain Pathology*, 9(4), 681-693. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00550.x>
- Caballero, B., Bourdenx, M., Luengo, E., Diaz, A., Sohn, P. D., Chen, X., Wang, C., Juste, Y. R., Wegmann, S., Patel, B., Young, Z. T., Kuo, S. Y., Rodriguez-Navarro, J. A., Shao, H., Lopez, M. G., Karch, C. M., Goate, A. M., Gestwicki, J. E., Hyman, B. T., ... Cuervo, A. M. (2021). Acetylated tau inhibits chaperone-mediated autophagy and promotes tau pathology propagation in mice. *Nature Communications*, 12(1), 2238. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22501-9>
- Cai, R., Pan, C., Ghasemigharagoz, A., Todorov, M. I., Förster, B., Zhao, S., Bhatia, H. S., Parra-Damas, A., Mrowka, L., Theodorou, D., Rempfler, M., Xavier, A. L. R., Kress, B. T., Benakis, C., Steinke, H., Liebscher, S., Bechmann, I., Liesz, A., Menze, B., ... Ertürk, A. (2019). Panoptic imaging of transparent mice reveals whole-body neuronal projections and skull-meninges connections. *Nature Neuroscience*, 22(2), 317-327. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0301-3>
- Caillierez, R., Bégard, S., Lécolle, K., Deramecourt, V., Zommer, N., Dujardin, S., Loyens, A., Dufour, N., Aurégan, G., Winderickx, J., Hantraye, P., Déglon, N., Buée, L., & Colin, M. (2013). Lentiviral Delivery of the Human Wild-type Tau Protein Mediates a Slow and Progressive

- Neurodegenerative Tau Pathology in the Rat Brain. *Molecular Therapy*, 21(7), 1358-1368. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.66>
- Camilleri, A., Ghio, S., Caruana, M., Weckbecker, D., Schmidt, F., Kamp, F., Leonov, A., Ryazanov, S., Griesinger, C., Giese, A., Cauchi, R. J., & Vassallo, N. (2020). Tau-induced mitochondrial membrane perturbation is dependent upon cardiolipin. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1862(2), 183064. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183064>
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., & Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 669-672. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.669>
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavallese, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chrétien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, G.-J., ... Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 467(7313), 318-322. <https://doi.org/10.1038/nature09328>
- Chai, X., Dage, J. L., & Citron, M. (2012). Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiology of Disease*, 48(3), 356-366. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.05.021>
- Chauderlier, A., Gilles, M., Spolcova, A., Caillierez, R., Chwastyniak, M., Kress, M., Drobecq, H., Bonnefoy, E., Pinet, F., Weil, D., Buée, L., Galas, M.-C., & Lefebvre, B. (2018). Tau/DDX6 interaction increases microRNA activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1861(8), 762-772. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2018.06.006>
- Chen, W. T., Liu, W. K., & Yen, S. H. (1994). Expression of tau exon 8 in different species. *Neuroscience Letters*, 172(1-2), 167-170. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90688-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90688-2)
- Chen, X., Wolfe, D. A., Bindu, D. S., Zhang, M., Taskin, N., Goertsen, D., Shay, T. F., Sullivan, E. E., Huang, S.-F., Ravindra Kumar, S., Arokiaaraj, C. M., Plattner, V. M., Campos, L. J., Mich, J. K., Monet, D., Ngo, V., Ding, X., Omstead, V., Weed, N., ... Gradinaru, V. (2023). Functional gene delivery to and across brain vasculature of systemic AAVs with endothelial-specific tropism in rodents and broad tropism in primates. *Nature Communications*, 14, 3345. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38582-7>
- Chothia, C., Novotný, J., Brucoleri, R., & Karplus, M. (1985). Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *Journal of Molecular Biology*, 186(3), 651-663. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90137-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90137-8)
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(23), 9535-9540. <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. *Nature Cell Biology*, 11(7), 909-913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>

- Cohen, S. J., & Stackman, R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, 285, 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>
- Colin, M., Dujardin, S., Schraen-Maschke, S., Meno-Tetang, G., Duyckaerts, C., Courade, J.-P., & Buée, L. (2020). From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathologica*, 139(1), 3-25. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02087-9>
- Collin, L., Bohrmann, B., Göpfert, U., Oroszlan-Szovik, K., Ozmen, L., & Grüninger, F. (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), 2834-2846. <https://doi.org/10.1093/brain/awu213>
- Congdon, E. E., Chukwu, J. E., Shamir, D. B., Deng, J., Ujla, D., Sait, H. B. R., Neubert, T. A., Kong, X.-P., & Sigurdsson, E. M. (2019). Tau antibody chimerization alters its charge and binding, thereby reducing its cellular uptake and efficacy. *EBioMedicine*, 42, 157-173. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.033>
- Congdon, E. E., Ji, C., Tetlow, A. M., Jiang, Y., & Sigurdsson, E. M. (2023). Tau-targeting therapies for Alzheimer disease: Current status and future directions. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00883-2>
- Congdon, E. E., Pan, R., Jiang, Y., Sandusky-Beltran, L. A., Dodge, A., Lin, Y., Liu, M., Kuo, M.-H., Kong, X.-P., & Sigurdsson, E. M. (2022). Single domain antibodies targeting pathological tau protein: Influence of four IgG subclasses on efficacy and toxicity. *eBioMedicine*, 84, 104249. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104249>
- Conrath, K. E., Wernery, U., Muyldermans, S., & Nguyen, V. K. (2003). Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in *Camelidae*. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(2), 87-103. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(02\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(02)00071-X)
- Cope, T. E., Rittman, T., Borchert, R. J., Jones, P. S., Vatansever, D., Allinson, K., Passamonti, L., Vazquez Rodriguez, P., Bevan-Jones, W. R., O'Brien, J. T., & Rowe, J. B. (2018). Tau burden and the functional connectome in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain*, 141(2), 550-567. <https://doi.org/10.1093/brain/awx347>
- Coppieters, K., Dreier, T., Silence, K., de Haard, H., Lauwereys, M., Casteels, P., Beirnaert, E., Jonckheere, H., Van de Wiele, C., Staelens, L., Hostens, J., Revets, H., Remaut, E., Elewaut, D., & Rottiers, P. (2006). Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(6), 1856-1866. <https://doi.org/10.1002/art.21827>
- 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. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 17(8), 1025-1033. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2010.04.020>
- Cotman, C. W., Poon, W. W., Rissman, R. A., & Blurton-Jones, M. (2005). The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(2), 104-112. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.2.104>

- Couchie, D., & Nunez, J. (1985). Immunological characterization of microtubule-associated proteins specific for the immature brain. *FEBS Letters*, 188(2), 331-335. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80397-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80397-5)
- 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., ... Citron, M. (2018). Epitope determines efficacy of therapeutic anti-Tau antibodies in a functional assay with human Alzheimer Tau. *Acta Neuropathologica*, 136(5), 729-745. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1911-2>
- Cox, K., Combs, B., Abdelmesih, B., Morfini, G., Brady, S. T., & Kanaan, N. M. (2016). Analysis of isoform-specific tau aggregates suggests a common toxic mechanism involving similar pathological conformations and axonal transport inhibition. *Neurobiology of Aging*, 47, 113-126. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.07.015>
- Creekmore, B. C., Watanabe, R., & Lee, E. B. (2024). Neurodegenerative Disease Tauopathies. *Annual Review of Pathology*, 19, 345-370. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051222-120750>
- Crivianu-Gaita, V., & Thompson, M. (2016). Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments : An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. *Biosensors and Bioelectronics*, 85, 32-45. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.091>
- Dam, T., Boxer, A. L., Golbe, L. I., Höglinger, G. U., Morris, H. R., Litvan, I., Lang, A. E., Corvol, J.-C., Aiba, I., Grundman, M., Yang, L., Tidemann-Miller, B., Kupferman, J., Harper, K., Kamisoglu, K., Wald, M. J., Graham, D. L., Gedney, L., O'Gorman, J., ... PASSPORT Study Group. (2021). Safety and efficacy of anti-tau monoclonal antibody gosuranemab in progressive supranuclear palsy : A phase 2, randomized, placebo-controlled trial. *Nature Medicine*, 27(8), 1451-1457. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01455-x>
- Danis, C., Dupré, E., Bouillet, T., Denéchaud, M., Lefebvre, C., Nguyen, M., Morteletque, J., Cantrelle, F.-X., Rain, J.-C., Hanouille, X., Colin, M., Buée, L., & Landrieu, I. (2025). Inhibition of tau neuronal internalization using anti-tau single domain antibodies. *Nature Communications*, 16(1), 3162. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58383-4>
- Danis, C., Dupré, E., Zejnelli, O., Caillierez, R., Arrial, A., Bégard, S., Morteletque, J., Eddarkaoui, S., Loyens, A., Cantrelle, F.-X., Hanouille, X., Rain, J.-C., Colin, M., Buée, L., & Landrieu, I. (2022). Inhibition of Tau seeding by targeting Tau nucleation core within neurons with a single domain antibody fragment. *Molecular Therapy*, 30(4), 1484-1499. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.01.009>
- Darricau, M., Katsinelos, T., Raschella, F., Milekovic, T., Crochemore, L., Li, Q., Courtine, G., McEwan, W. A., Dehay, B., Bezard, E., & Planche, V. (2023). Tau seeds from patients induce progressive supranuclear palsy pathology and symptoms in primates. *Brain: A Journal of Neurology*, 146(6), 2524-2534. <https://doi.org/10.1093/brain/awac428>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4586-4591. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505379103>
- De Leiris, N., Perret, P., Lombardi, C., Gözel, B., Chierici, S., Millet, P., Debiossat, M., Bacot, S., Tournier, B. B., Chames, P., Lenormand, J.-L., Ghezzi, C., Fagret, D., & Moulin, M. (2024). A single-domain

- antibody for the detection of pathological Tau protein in the early stages of oligomerization. *Journal of Translational Medicine*, 22, 163. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-04987-1>
- Deacon, R. M. J., Croucher, A., & Rawlins, J. N. P. (2002). Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behavioural Brain Research*, 132(2), 203-213. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(01\)00401-6](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(01)00401-6)
- Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2005). Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice. *Behavioural Brain Research*, 156(2), 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.027>
- de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D. H., Kopeikina, K. J., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K. H., Carlson, G. A., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*, 73(4), 685-697. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>
- Dehay, B., Dalkara, D., Dovero, S., Li, Q., & Bezard, E. (2012). Systemic scAAV9 variant mediates brain transduction in newborn rhesus macaques. *Scientific Reports*, 2, 253. <https://doi.org/10.1038/srep00253>
- Delacourte, A., David, J. P., Sergeant, N., Buée, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., Petit, H., & Di Menza, C. (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52(6), 1158-1158. <https://doi.org/10.1212/WNL.52.6.1158>
- DeVos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., Chen, G., Shen, T., Tran, H., Nichols, B., Zanardi, T. A., Kordasiewicz, H. B., Swayze, E. E., Bennett, C. F., Diamond, M. I., & Miller, T. M. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Science Translational Medicine*, 9(374), eaag0481. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0481>
- Dhapola, R., Kumari, S., Sharma, P., Vellingiri, B., & HariKrishnaReddy, D. (2025). Advancements in autophagy perturbations in Alzheimer's disease : Molecular aspects and therapeutics. *Brain Research*, 1851, 149494. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2025.149494>
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E., & Holzbaur, E. L. F. (2008). Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5866), 1086-1089. <https://doi.org/10.1126/science.1152993>
- Donald, C. L. M., Dikranian, K., Bayly, P., Holtzman, D., & Brody, D. (2007). Diffusion Tensor Imaging Reliably Detects Experimental Traumatic Axonal Injury and Indicates Approximate Time of Injury. *Journal of Neuroscience*, 27(44), 11869-11876. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3647-07.2007>
- DuBoff, B., Götz, J., & Feany, M. B. (2012). Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo. *Neuron*, 75(4), 618-632. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.026>
- Dujardin, S., Bégard, S., Caillierez, R., Lachaud, C., Carrier, S., Lieger, S., Gonzalez, J. A., Deramecourt, V., Déglon, N., Maurage, C.-A., Frosch, M. P., Hyman, B. T., Colin, M., & Buée, L. (2018). Different tau species lead to heterogeneous tau pathology propagation and misfolding. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0637-7>

- 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. (2014). Ectosomes : A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein. *PLoS ONE*, 9(6), e100760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>
- 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 Science: A Publication of the Protein Society*, 11(3), 500-515. <https://doi.org/10.1110/ps.34602>
- Dupré, E., Danis, C., Arrial, A., Hanouille, X., Homa, M., Cantrelle, F.-X., Merzougui, H., Colin, M., Rain, J.-C., Buée, L., & Landrieu, I. (2019). Single Domain Antibody Fragments as New Tools for the Detection of Neuronal Tau Protein in Cells and in Mice Studies. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(9), 3997-4006. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.9b00217>
- Duyckaerts, C., Benneicib, M., Grignon, Y., Uchihara, T., He, Y., Piette, F., & Hauw, J.-J. (1997). Modeling the Relation Between Neurofibrillary Tangles and Intellectual Status. *Neurobiology of Aging*, 18(3), 267-273. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)80306-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)80306-5)
- Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 5-36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>
- Edwards, A. L., Collins, J. A., Junge, C., Kordasiewicz, H., Mignon, L., Wu, S., Li, Y., Lin, L., DuBois, J., Hutchison, R. M., Ziogas, N., Shulman, M., Martarello, L., Graham, D., Lane, R., Budd Haeberlein, S., & Beaver, J. (2023). Exploratory Tau Biomarker Results From a Multiple Ascending-Dose Study of BIIB080 in Alzheimer Disease : A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 80(12), 1344-1352. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.3861>
- 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. *Scientific Reports*, 5, 9964. <https://doi.org/10.1038/srep09964>
- 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., ... Arancio, O. (2016). Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory. *Scientific Reports*, 6, 19393. <https://doi.org/10.1038/srep19393>
- 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*, 561(7721), 137-140. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0454-y>
- Falcon, B., Zhang, W., Schweighauser, M., Murzin, A. G., Vidal, R., Garringer, H. J., Ghetti, B., Scheres, S. H. W., & Goedert, M. (2018). Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathologica*, 136(5), 699-708. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1914-z>
- Falcon, B., Zivanov, J., Zhang, W., Murzin, A. G., Garringer, H. J., Vidal, R., Crowther, R. A., Newell, K. L., Ghetti, B., Goedert, M., & Scheres, S. H. W. (2019). Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature*, 568(7752), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1026-5>

- Feng, Q., Luo, Yu, Zhang, Xiang-Nan, Yang, Xi-Fei, Hong, Xiao-Yue, Sun, Dong-Shen, Li, Xia-Chun, Hu, Yu, Li, Xiao-Guang, Zhang, Jun-Fei, Li, Xiao, Yang, Ying, Wang, Qun, Liu, Gong-Ping, & Wang, J.-Z. (2020). MAPT/Tau accumulation represses autophagy flux by disrupting IST1-regulated ESCRT-III complex formation : A vicious cycle in Alzheimer neurodegeneration. *Autophagy*, 16(4), 641-658. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1633862>
- Figley, C. R., Uddin, M. N., Wong, K., Kornelsen, J., Puig, J., & Figley, T. D. (2022). Potential Pitfalls of Using Fractional Anisotropy, Axial Diffusivity, and Radial Diffusivity as Biomarkers of Cerebral White Matter Microstructure. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 799576. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.799576>
- 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 Biology*, 9(8), e1001120. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001120>
- Fleisher, A. S., Munsie, L. M., Perahia, D. G. S., Andersen, S. W., Higgins, I. A., Hauck, P. M., Lo, A. C., Sims, J. R., Brys, M., Mintun, M., & PERISCOPE-ALZ Site Investigators. (2024). Assessment of Efficacy and Safety of Zaganemab : Results From PERISCOPE-ALZ, a Phase 2 Study in Early Symptomatic Alzheimer Disease. *Neurology*, 102(5), e208061. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000208061>
- Fletcher, A. J., Mallery, D. L., Watkinson, R. E., Dickson, C. F., & James, L. C. (2015). Sequential ubiquitination and deubiquitination enzymes synchronize the dual sensor and effector functions of TRIM21. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(32), 10014-10019. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507534112>
- Florian, H., Wang, D., Arnold, S. E., Boada, M., Guo, Q., Jin, Z., Zheng, H., Fisseha, N., Kalluri, H. V., Rendenbach-Mueller, B., Budur, K., & Gold, M. (2023). Tilavonemab in early Alzheimer's disease : Results from a phase 2, randomized, double-blind study. *Brain: A Journal of Neurology*, 146(6), 2275-2284. <https://doi.org/10.1093/brain/awad024>
- Fontaine, S. N., Zheng, D., Sabbagh, J. J., Martin, M. D., Chaput, D., Darling, A., Trotter, J. H., Stothert, A. R., Nordhues, B. A., Lussier, A., Baker, J., Shelton, L., Kahn, M., Blair, L. J., Stevens, S. M., & Dickey, C. A. (2016). DnaJ/Hsc70 chaperone complexes control the extracellular release of neurodegenerative-associated proteins. *The EMBO Journal*, 35(14), 1537-1549. <https://doi.org/10.15252/emj.201593489>
- Foust, K. D., Nurre, E., Montgomery, C. L., Hernandez, A., Chan, C. M., & Kaspar, B. K. (2009). Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nature Biotechnology*, 27(1), 59-65. <https://doi.org/10.1038/nbt.1515>
- Fowler, S. L., Behr, T. S., Turkes, E., O'Brien, D. P., Cauhy, P. M., Rawlinson, I., Edmonds, M., Foiani, M. S., Schaler, A., Crowley, G., Bez, S., Ficulle, E., Tsefou, E., Fischer, R., Geary, B., Gaur, P., Miller, C., D'Acunzo, P., Levy, E., ... Ryskeldi-Falcon, B. (2025). Tau filaments are tethered within brain extracellular vesicles in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 28(1), 40-48. <https://doi.org/10.1038/s41593-024-01801-5>
- Franzmeier, N., Brendel, M., Beyer, L., Slemann, L., Kovacs, G. G., Arzberger, T., Kurz, C., Respondek, G., Lukic, M. J., Biel, D., Rubinski, A., Frontzkowski, L., Hummel, S., Müller, A., Finze, A., Palleis, C., Joseph, E., Weidinger, E., Katzdobler, S., ... Ewers, M. (2022). Tau deposition patterns are associated with functional connectivity in primary tauopathies. *Nature Communications*, 13, 1362. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28896-3>

- Fu, H., DiRosario, J., Killedar, S., Zaraspe, K., & McCarty, D. M. (2011). Correction of Neurological Disease of Mucopolysaccharidosis IIIB in Adult Mice by rAAV9 Trans-Blood–Brain Barrier Gene Delivery. *Molecular Therapy*, 19(6), 1025-1033. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.34>
- Fu, Z.-Q., Yang, Y., Song, J., Jiang, Q., Lin, Z.-C., Wang, Q., Zhu, L.-Q., Wang, J.-Z., & Tian, Q. (2010). LiCl attenuates thapsigargin-induced tau hyperphosphorylation by inhibiting GSK-3 β in vivo and in vitro. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 21(4), 1107-1117. <https://doi.org/10.3233/jad-2010-100687>
- Fukumoto, H., Kao, T.-H., Tai, C.-Y., Jang, M.-K., & Miyamoto, M. (2024). High-molecular-weight oligomer tau (HMWoTau) species are dramatically increased in Braak-stage dependent manner in the frontal lobe of human brains, demonstrated by a novel oligomer Tau ELISA with a mouse monoclonal antibody (APNmAb005). *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 38(22), e70160. <https://doi.org/10.1096/fj.202401704R>
- Fulga, T. A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M. L., Spires, T. L., Hyman, B. T., & Feany, M. B. (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nature Cell Biology*, 9(2), 139-148. <https://doi.org/10.1038/ncb1528>
- Fuller, J. P., Stavenhagen, J. B., & Teeling, J. L. (2014). New roles for Fc receptors in neurodegeneration—the impact on Immunotherapy for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00235>
- Funk, K. E., Mirbaha, H., Jiang, H., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. (2015). Distinct Therapeutic Mechanisms of Tau Antibodies : PROMOTING MICROGLIAL CLEARANCE VERSUS BLOCKING NEURONAL UPTAKE *. *Journal of Biological Chemistry*, 290(35), 21652-21662. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657924>
- Gaikwad, S., Puangmalai, N., Sonawane, M., Montalbano, M., Price, R., Iyer, M. S., Ray, A., Moreno, S., & Kayed, R. (2024). Nasal tau immunotherapy clears intracellular tau pathology and improves cognitive functions in aged tauopathy mice. *Science Translational Medicine*, 16(754), eadj5958. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.adj5958>
- Ganguly, P., Do, T. D., Larini, L., LaPointe, N. E., Sercel, A. J., Shade, M. F., Feinstein, S. C., Bowers, M. T., & Shea, J.-E. (2015). Tau Assembly : The Dominant Role of PHF6 (VQIVYK) in Microtubule Binding Region Repeat R3. *The journal of physical chemistry. B*, 119(13), 4582-4593. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00175>
- Gary, C., Lam, S., Hérard, A.-S., Koch, J. E., Petit, F., Gipchtein, P., Sawiak, S. J., Caillierez, R., Eddarkaoui, S., Colin, M., Aujard, F., Deslys, J.-P., French Neuropathology Network, Brouillet, E., Buée, L., Comoy, E. E., Pifferi, F., Picq, J.-L., & Dhenain, M. (2019). Encephalopathy induced by Alzheimer brain inoculation in a non-human primate. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0771-x>
- Ghaemmaghani, S., Russo, M., & Renslo, A. R. (2014). Successes and Challenges in Phenotype-Based Lead Discovery for Prion Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(16), 6919-6929. <https://doi.org/10.1021/jm5001425>
- Ginn, S. L., Liao, S. H., Dane, A. P., Hu, M., Hyman, J., Finnie, J. W., Zheng, M., Cavazzana-Calvo, M., Alexander, S. I., Thrasher, A. J., & Alexander, I. E. (2010). Lymphomagenesis in SCID-X1 Mice Following Lentivirus-mediated Phenotype Correction Independent of Insertional Mutagenesis

- and γ c Overexpression. *Molecular Therapy*, 18(5), 965-976. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.50>
- Godakova, S. A., Noskov, A. N., Vinogradova, I. D., Ugriumova, G. A., Solovyev, A. I., Esmagambetov, I. B., Tukhvatulin, A. I., Logunov, D. Y., Naroditsky, B. S., Shcheblyakov, D. V., & Gintsburg, A. L. (2019). Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice. *Toxins*, 11(8), 464. <https://doi.org/10.3390/toxins11080464>
- Godoy Muñoz, J. M., Neset, L., Markússon, S., Weber, S., Krokengen, O. C., Sutinen, A., Christakou, E., Lopez, A. J., Bramham, C. R., & Kursula, P. (2024). Structural characterization of two nanobodies targeting the ligand-binding pocket of human Arc. *PLOS ONE*, 19(4), e0300453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300453>
- 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(6600), 550-553. <https://doi.org/10.1038/383550a0>
- Goedert, M., Jakes, R., & Vanmechelen, E. (1995). Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neuroscience Letters*, 189(3), 167-169. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11484-e](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11484-e)
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., & Crowther, R. A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats : Differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *The EMBO Journal*, 8(2), 393-399. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03390.x>
- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., & Klug, A. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease : Identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(11), 4051-4055.
- Goel, U., Zanwar, S., Cowan, A. J., Banerjee, R., Khouri, J., & Dima, D. (2025). Ciltacabtagene Autoleucl for the Treatment of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma : Efficacy, Safety, and Place in Therapy. *Cancer Management and Research*, 17, 357-372. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S510408>
- Goertsen, D., Flytzanis, N. C., Goeden, N., Chuapoco, M. R., Cummins, A., Chen, Y., Fan, Y., Zhang, Q., Sharma, J., Duan, Y., Wang, L., Feng, G., Chen, Y., Ip, N. Y., Pickel, J., & Gradinaru, V. (2022). AAV capsid variants with brain-wide transgene expression and decreased liver targeting after intravenous delivery in mouse and marmoset. *Nature Neuroscience*, 25(1), 106-115. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00969-4>
- Gonçalves, R. A., Wijesekara, N., Fraser, P. E., & De Felice, F. G. (2020). Behavioral Abnormalities in Knockout and Humanized Tau Mice. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 124. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00124>
- Gong, B., Zhang, W., Cong, W., Gu, Y., Ji, W., Yin, T., Zhou, H., Hu, H., Zhuang, J., Luo, Y., Liu, Y., Gao, J., & Yin, Y. (2024). Systemic Administration of Neurotransmitter-Derived Lipidoids-PROTACs-DNA Nanocomplex Promotes Tau Clearance and Cognitive Recovery for Alzheimer's Disease Therapy. *Advanced Healthcare Materials*, 13(32), e2400149. <https://doi.org/10.1002/adhm.202400149>

- Gould, T. D. (Éd.). (2009). *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice : Characterization Using Behavioral Tests* (Vol. 42). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1970-1979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242818>
- Greenberg, A. S., Hughes, A. L., Guo, J., Avila, D., McKinney, E. C., & Flajnik, M. F. (1996). A novel « chimeric » antibody class in cartilaginous fish : IgM may not be the primordial immunoglobulin. *European Journal of Immunology*, 26(5), 1123-1129. <https://doi.org/10.1002/eji.1830260525>
- Greenwood, J. A., & Johnson, G. V. (1995). Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Experimental Cell Research*, 220(2), 332-337. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1323>
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S., & Wisniewski, H. M. (1986). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(13), 6084-6089.
- Gruntman, A. M., Su, L., & Flotte, T. R. (2017). Retro-Orbital Venous Sinus Delivery of rAAV9 Mediates High-Level Transduction of Brain and Retina Compared with Temporal Vein Delivery in Neonatal Mouse Pups. *Human Gene Therapy*, 28(3), 228-230. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.037>
- Gu, Y., Oyama, F., & Ihara, Y. (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1235-1244. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031235.x>
- Guillozet-Bongaarts, A. L., Garcia-Sierra, F., Reynolds, M. R., Horowitz, P. M., Fu, Y., Wang, T., Cahill, M. E., Bigio, E. H., Berry, R. W., & Binder, L. I. (2005). Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 26(7), 1015-1022. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.019>
- Guo, T., Noble, W., & Hanger, D. P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 133(5), 665-704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry*, 33(32), 9511-9522. <https://doi.org/10.1021/bi00198a017>
- Habiba, U., Descallar, J., Kreilau, F., Adhikari, U. K., Kumar, S., Morley, J. W., Bui, B. V., Koronyo-Hamaoui, M., & Tayebi, M. (2021). Detection of retinal and blood Aβ oligomers with nanobodies. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/dad2.12193>
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., ... Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5644), 415-419. <https://doi.org/10.1126/science.1088547>

- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., & Hammers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446-448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
- Harris, J. A., Koyama, A., Maeda, S., Ho, K., Devidze, N., Dubal, D. B., Yu, G.-Q., Masliah, E., & Mucke, L. (2012). Human P301L-mutant tau expression in mouse entorhinal-hippocampal network causes tau aggregation and presynaptic pathology but no cognitive deficits. *PloS One*, 7(9), e45881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045881>
- 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., Lavery, M., Lee, J., Levitan, D., Lu, S. X., Maguire, M., Mahadomrongkul, V., McEachern, E. J., Ouyang, X., Rosahl, T. W., ... 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. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0181-0>
- Hauler, F., Mallery, D. L., McEwan, W. A., Bidgood, S. R., & James, L. C. (2012). AAA ATPase p97/VCP is essential for TRIM21-mediated virus neutralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(48), 19733-19738. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210659109>
- He, H. J., Wang, X. S., Pan, R., Wang, D. L., Liu, M. N., & He, R. Q. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biology*, 10, 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-81>
- Hellström, S., Sajanti, A., Jhaveri, A., Srinath, A., Bennett, C., Cao, Y., Koskimäki, F., Falter, J., Frantzen, J., Lyne, S. B., Rantamäki, T., Takala, R., Posti, J. P., Roine, S., Kolehmainen, S., Jänkälä, M., Puolitaival, J., Girard, R., Rahi, M., ... Koskimäki, J. (2025). Diagnostic and prognostic performance of urine ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 across multiple acute brain injury types – A longitudinal prospective cohort study. *Brain and Spine*, 5, 104173. <https://doi.org/10.1016/j.bas.2024.104173>
- Hill, E., Karikari, T. K., Moffat, K. G., Richardson, M. J. E., & Wall, M. J. (2019). Introduction of Tau Oligomers into Cortical Neurons Alters Action Potential Dynamics and Disrupts Synaptic Transmission and Plasticity. *eNeuro*, 6(5), ENEURO.0166-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0166-19.2019>
- Himmler, A. (1989). Structure of the bovine tau gene : Alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Molecular and Cellular Biology*, 9(4), 1389-1396.
- Hochgräfe, K., Sydow, A., Matenia, D., Cadinu, D., Könen, S., Petrova, O., Pickhardt, M., Goll, P., Morellini, F., Mandelkow, E., & Mandelkow, E.-M. (2015). Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau. *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 25. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0204-4>
- Höglinger, G. U., Litvan, I., Mendonca, N., Wang, D., Zheng, H., Rendenbach-Mueller, B., Lon, H.-K., Jin, Z., Fisseha, N., Budur, K., Gold, M., Ryman, D., Florian, H., Ahmed, A., Aiba, I., Albanese, A., Bertram, K., Bordelon, Y., Bower, J., ... Zesiewicz, T. (2021). Safety and efficacy of tilavonemab in progressive supranuclear palsy : A phase 2, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 20(3), 182-192. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30489-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30489-0)
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), E3138-3147. <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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), E4376-E4385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411649111>
- Holmes, H. E., Colgan, N., Ismail, O., Ma, D., Powell, N. M., O'Callaghan, J. M., Harrison, I. F., Johnson, R. A., Murray, T. K., Ahmed, Z., Heggenes, M., Fisher, A., Cardoso, M. J., Modat, M., Walker-Samuel, S., Fisher, E. M. C., Ourselin, S., O'Neill, M. J., Wells, J. A., ... Lythgoe, M. F. (2016). Imaging the accumulation and suppression of tau pathology using multiparametric MRI. *Neurobiology of Aging*, 39, 184-194. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.12.001>
- Holper, S., Watson, R., & Yassi, N. (2022). Tau as a Biomarker of Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7307. <https://doi.org/10.3390/ijms23137307>
- 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(6), 1067-1081. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>
- Hosokawa, M., Arai, T., Masuda-Suzukake, M., Nonaka, T., Yamashita, M., Akiyama, H., & Hasegawa, M. (2012). Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PloS One*, 7(12), e52389. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052389>
- Hosokawa, M., Masuda-Suzukake, M., Shitara, H., Shimozaawa, A., Suzuki, G., Kondo, H., Nonaka, T., Campbell, W., Arai, T., & Hasegawa, M. (2022). Development of a novel tau propagation mouse model endogenously expressing 3 and 4 repeat tau isoforms. *Brain*, 145(1), 349-361. <https://doi.org/10.1093/brain/awab289>
- Howard, R., Zubko, O., Bradley, R., Harper, E., Pank, L., O'Brien, J., Fox, C., Tabet, N., Livingston, G., Bentham, P., McShane, R., Burns, A., Ritchie, C., Reeves, S., Lovestone, S., Ballard, C., Noble, W., Nilforooshan, R., Wilcock, G., ... Minocycline in Alzheimer Disease Efficacy (MADE) Trialist Group. (2020). Minocycline at 2 Different Dosages vs Placebo for Patients With Mild Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology*, 77(2), 164-174. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.3762>
- Hu, W., Zhang, X., Tung, Y. C., Xie, S., Liu, F., & Iqbal, K. (2016). Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(10), 1066-1077. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.014>
- Huang, Q., Chan, K. Y., Tobey, I. G., Chan, Y. A., Poterba, T., Boutros, C. L., Balazs, A. B., Daneman, R., Bloom, J. M., Seed, C., & Deverman, B. E. (2019). Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. *PloS One*, 14(11), e0225206. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225206>
- Huang, W., Manglik, A., Venkatakrishnan, A. J., Laeremans, T., Feinberg, E. N., Sanborn, A. L., Kato, H. E., Livingston, K. E., Thorsen, T. S., Kling, R. C., Granier, S., Gmeiner, P., Husbands, S. M., Traynor, J. R., Weis, W. I., Steyaert, J., Dror, R. O., & Kobilka, B. K. (2015). Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature*, 524(7565), 315-321. <https://doi.org/10.1038/nature14886>

- Hughes, M. P., Smith, D. A., Morris, L., Fletcher, C., Colaco, A., Huebecker, M., Tordo, J., Palomar, N., Massaro, G., Henckaerts, E., Waddington, S. N., Platt, F. M., & Rahim, A. A. (2018). AAV9 intracerebroventricular gene therapy improves lifespan, locomotor function and pathology in a mouse model of Niemann–Pick type C1 disease. *Human Molecular Genetics*, 27(17), 3079-3098. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy212>
- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R. C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., ... Heutink, P. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature*, 393(6686), 702-705. <https://doi.org/10.1038/31508>
- Ibrahim, A. F. M., Shen, L., Tatham, M. H., Dickerson, D., Prescott, A. R., Abidi, N., Xirodimas, D. P., & Hay, R. T. (2020). Antibody RING-Mediated Destruction of Endogenous Proteins. *Molecular Cell*, 79(1), 155-166.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.032>
- Igel, A., Fornara, B., Rezaei, H., & Béringue, V. (2023). Prion assemblies : Structural heterogeneity, mechanisms of formation, and role in species barrier. *Cell and Tissue Research*, 392(1), 149-166. <https://doi.org/10.1007/s00441-022-03700-2>
- Irwin, D. J., Brettschneider, J., McMillan, C. T., Cooper, F., Olm, C., Arnold, S. E., Van Deerlin, V. M., Seeley, W. W., Miller, B. L., Lee, E. B., Lee, V. M.-Y., Grossman, M., & Trojanowski, J. Q. (2016). Deep clinical and neuropathological phenotyping of Pick disease. *Annals of Neurology*, 79(2), 272-287. <https://doi.org/10.1002/ana.24559>
- Ishizuka, Y., Mergiya, T. F., Baldinotti, R., Xu, J., Hallin, E. I., Markússon, S., Kursula, P., & Bramham, C. R. (2022). Development and Validation of Arc Nanobodies : New Tools for Probing Arc Dynamics and Function. *Neurochemical Research*, 47(9), 2656-2666. <https://doi.org/10.1007/s11064-022-03573-5>
- Ising, C., Gallardo, G., Leyns, C. E. G., Wong, C. H., Jiang, H., Stewart, F., Koscal, L. J., Roh, J., Robinson, G. O., Remolina Serrano, J., & Holtzman, D. M. (2017). AAV-mediated expression of anti-tau scFvs decreases tau accumulation in a mouse model of tauopathy. *Journal of Experimental Medicine*, 214(5), 1227-1238. <https://doi.org/10.1084/jem.20162125>
- Islam, T., Hill, E., Abrahamson, E. E., Servaes, S., Smirnov, D. S., Zeng, X., Sehwat, A., Chen, Y., Kac, P. R., Kvartsberg, H., Olsson, M., Sjons, E., Gonzalez-Ortiz, F., Therriault, J., Tissot, C., Del Popolo, I., Rahmouni, N., Richardson, A., Mitchell, V., ... Karikari, T. K. (2025). Phospho-tau serine-262 and serine-356 as biomarkers of pre-tangle soluble tau assemblies in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 31(2), 574-588. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03400-0>
- Issa, S. S., Shaimardanova, A. A., Solovyeva, V. V., & Rizvanov, A. A. (2023). Various AAV Serotypes and Their Applications in Gene Therapy : An Overview. *Cells*, 12(5), 785. <https://doi.org/10.3390/cells12050785>
- Jeganathan, S., Hascher, A., Chinnathambi, S., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2008). Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 32066-32076. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805300200>
- Jiang, Y., Lin, Y., Krishnaswamy, S., Pan, R., Wu, Q., Sandusky-Beltran, L. A., Liu, M., Kuo, M.-H., Kong, X.-P., Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2023). Single-domain antibody-based noninvasive

- in vivo imaging of α -synuclein or tau pathology. *Science Advances*, 9(19), eadf3775. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf3775>
- Jiang, Y., Tetlow, A. M., Lin, Y., Ji, C., Laborc, K. F., Mar, A. C., Pan, R., Kong, X.-P., Congdon, E. E., & Sigurdsson, E. M. (2025). Single-Domain Antibody-Based Autophagosome-Targeting Chimera for Tau Clearance and Motor Function Restoration in Tauopathies. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2025.06.30.662446. <https://doi.org/10.1101/2025.06.30.662446>
- Jimenez, J. C., Su, K., Goldberg, A. R., Luna, V. M., Biane, J. S., Ordek, G., Zhou, P., Ong, S. K., Wright, M. A., Zweifel, L., Paninski, L., Hen, R., & Kheirbek, M. A. (2018). Anxiety Cells in a Hippocampal-Hypothalamic Circuit. *Neuron*, 97(3), 670-683.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.016>
- Jin, M., Shiwaku, H., Tanaka, H., Obita, T., Ohuchi, S., Yoshioka, Y., Jin, X., Kondo, K., Fujita, K., Homma, H., Nakajima, K., Mizuguchi, M., & Okazawa, H. (2021). Tau activates microglia via the PQBP1-cGAS-STING pathway to promote brain inflammation. *Nature Communications*, 12(1), 6565. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26851-2>
- Joensuu, M., Padmanabhan, P., Durisic, N., Bademosi, A. T. D., Cooper-Williams, E., Morrow, I. C., Harper, C. B., Jung, W., Parton, R. G., Goodhill, G. J., Papadopoulos, A., & Meunier, F. A. (2016). Subdiffractional tracking of internalized molecules reveals heterogeneous motion states of synaptic vesicles. *Journal of Cell Biology*, 215(2), 277-292. <https://doi.org/10.1083/jcb.201604001>
- Jung, D., Filliol, D., Miehe, M., & Rendon, A. (1993). Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP2 or TAU. *Cell Motility*, 24(4), 245-255. <https://doi.org/10.1002/cm.970240405>
- Kahlson, M. A., & Colodner, K. J. (2016). Glial Tau Pathology in Tauopathies : Functional Consequences. *Journal of Experimental Neuroscience*, 9(Suppl 2), 43-50. <https://doi.org/10.4137/JEN.S25515>
- Kanazawa, T., Morisaki, K., Suzuki, S., & Takashima, Y. (2014). Prolongation of life in rats with malignant glioma by intranasal siRNA/drug codelivery to the brain with cell-penetrating peptide-modified micelles. *Molecular Pharmaceutics*, 11(5), 1471-1478. <https://doi.org/10.1021/mp400644e>
- Kang, S., Son, S. M., Baik, S. H., Yang, J., & Mook-Jung, I. (2019). Autophagy-Mediated Secretory Pathway is Responsible for Both Normal and Pathological Tau in Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 70(3), 667-680. <https://doi.org/10.3233/JAD-190180>
- Kanmert, D., Cantlon, A., Muratore, C. R., Jin, M., O'Malley, T. T., Lee, G., Young-Pearse, T. L., Selkoe, D. J., & Walsh, D. M. (2015). C-Terminally Truncated Forms of Tau, But Not Full-Length Tau or Its C-Terminal Fragments, Are Released from Neurons Independently of Cell Death. *The Journal of Neuroscience*, 35(30), 10851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0387-15.2015>
- Karch, C. M., Jeng, A. T., & Goate, A. M. (2012). Extracellular Tau Levels Are Influenced by Variability in Tau That Is Associated with Tauopathies. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42751-42762. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.380642>
- Katsinelos, T., Tuck, B. J., Mukadam, A. S., & McEwan, W. A. (2019). The Role of Antibodies and Their Receptors in Protection Against Ordered Protein Assembly in Neurodegeneration. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01139>

- 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 Reports*, 23(7), 2039-2055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>
- Katsumoto, A., Takeuchi, H., & Tanaka, F. (2019). Tau Pathology in Chronic Traumatic Encephalopathy and Alzheimer's Disease : Similarities and Differences. *Frontiers in Neurology*, 10, 980. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00980>
- Keller, L., Bery, N., Tardy, C., Ligat, L., Favre, G., Rabbitts, T. H., & Olichon, A. (2019). Selection and Characterization of a Nanobody Biosensor of GTP-Bound RHO Activities. *Antibodies (Basel, Switzerland)*, 8(1), 8. <https://doi.org/10.3390/antib8010008>
- Khamrui, S., Turley, S., Pardon, E., Steyaert, J., Fan, E., Verlinde, C. L. M. J., Bergman, L. W., & Hol, W. G. J. (2013). The structure of the D3 domain of Plasmodium falciparum myosin tail interacting protein MTIP in complex with a nanobody. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 190(2), 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.06.003>
- Kheirbek, M. A., Drew, L. J., Burghardt, N. S., Costantini, D. O., Tannenholz, L., Ahmari, S. E., Zeng, H., Fenton, A. A., & Hen, R. (2013). Differential Control of Learning and Anxiety along the Dorsoventral Axis of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 77(5), 955-968. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.038>
- Khong Nguyen, V., Hamers, R., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1999). Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies1. *Molecular Immunology*, 36(8), 515-524. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(99\)00067-X](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(99)00067-X)
- Kidd, M. (1963). Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature*, 197(4863), 192-193. <https://doi.org/10.1038/197192b0>
- Kim, S.-H., Cho, Y.-S., Kim, Y., Park, J., Yoo, S.-M., Gwak, J., Kim, Y., Gwon, Y., Kam, T., & Jung, Y.-K. (2023). Endolysosomal impairment by binding of amyloid beta or MAPT/Tau to V-ATPase and rescue via the HYAL-CD44 axis in Alzheimer disease. *Autophagy*, 19(8), 2318-2337. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2181614>
- Kimura, T., Whitcomb, D. J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G. L., Takashima, A., & Cho, K. (2014). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633), 20130144. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>
- Kinoshita, S., Nakakido, M., Mori, C., Kuroda, D., Caaveiro, J. M. M., & Tsumoto, K. (2022). Molecular basis for thermal stability and affinity in a VHH : Contribution of the framework region and its influence in the conformation of the CDR3. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 31(11), e4450. <https://doi.org/10.1002/pro.4450>
- Klarenbeek, A., Mazouari, K. E., Desmyter, A., Blanchetot, C., Hultberg, A., de Jonge, N., Roovers, R. C., Cambillau, C., Spinelli, S., Del-Favero, J., Verrips, T., de Haard, H. J., & Achour, I. (2015). Camelid Ig V genes reveal significant human homology not seen in therapeutic target genes, providing for a powerful therapeutic antibody platform. *mAbs*, 7(4), 693-706. <https://doi.org/10.1080/19420862.2015.1046648>

- Klein, C., Krämer, E.-M., Cardine, A.-M., Schraven, B., Brandt, R., & Trotter, J. (2002). Process Outgrowth of Oligodendrocytes Is Promoted by Interaction of Fyn Kinase with the Cytoskeletal Protein Tau. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 698-707. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00698.2002>
- Knops, J., Kosik, K. S., Lee, G., Pardee, J. D., Cohen-Gould, L., & McConlogue, L. (1991). Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *The Journal of Cell Biology*, 114(4), 725-733.
- Komori, T. (1999). Tau-positive glial inclusions in progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration and Pick's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 9(4), 663-679. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00549.x>
- Kondo, A., Shahpasand, K., Mannix, R., Qiu, J., Moncaster, J., Chen, C.-H., Yao, Y., Lin, Y.-M., Driver, J. A., Sun, Y., Wei, S., Luo, M.-L., Albayram, O., Huang, P., Rotenberg, A., Ryo, A., Goldstein, L. E., Pascual-Leone, A., McKee, A. C., ... Lu, K. P. (2015). Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy. *Nature*, 523(7561), 431-436. <https://doi.org/10.1038/nature14658>
- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Novak, P., & Novak, M. (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>
- Köpke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24374-24384.
- Kovacech, B., Cullen, N. C., Novak, P., Hanes, J., Kontsekova, E., Katina, S., Parrak, V., Fresser, M., Vanbrabant, J., Feldman, H. H., Winblad, B., Stoops, E., Vanmechelen, E., & Zilka, N. (2024). Post hoc analysis of ADAMANT, a phase 2 clinical trial of active tau immunotherapy with AADvac1 in patients with Alzheimer's disease, positive for plasma p-tau217. *Alzheimer's Research & Therapy*, 16(1), 254. <https://doi.org/10.1186/s13195-024-01620-7>
- Kraeuter, A.-K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1916, 105-111. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W.-K., & Yen, S.-H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Research*, 597(2), 209-219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91476-U](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91476-U)
- Kumar, A. V., Mills, J., & Lapierre, L. R. (2022). Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.793328>
- Lam, S., Petit, F., Hérard, A.-S., Boluda, S., Eddarkaoui, S., Guillermier, M., Letournel, F., Martin-Négrier, M.-L., Faisant, M., Godfraind, C., Boutonnat, J., Maurage, C.-A., Deramecourt, V., Duchesne, M., Meyronet, D., Fenouil, T., de Paula, A. M., Rigau, V., Vandenbos-Burel, F., ... The Brain Bank Neuro-C. E. B. Neuropathology Network. (2021). Transmission of amyloid-beta and tau pathologies is associated with cognitive impairments in a primate. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01266-8>

- Lannuzel, A., Ruberg, M., & Michel, P. P. (2008). Atypical parkinsonism in the Caribbean island of Guadeloupe : Etiological role of the mitochondrial complex I inhibitor annonacin. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 23(15), 2122-2128. <https://doi.org/10.1002/mds.22300>
- 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. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-39>
- Lasagna-Reeves, C. A., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., Jackson, G. R., & Kaye, R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Scientific Reports*, 2, 700. <https://doi.org/10.1038/srep00700>
- Lauwereys, M., Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Kinne, J., Hölzer, W., De Genst, E., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1998). Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *The EMBO Journal*, 17(13), 3512-3520. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.13.3512>
- Lee, S.-H., Le Pichon, C. E., Adolfsson, O., Gafner, V., Pihlgren, M., Lin, H., Solanoy, H., Brendza, R., Ngu, H., Foreman, O., Chan, R., Ernst, J. A., DiCara, D., Hotzel, I., Srinivasan, K., Hansen, D. V., Atwal, J., Lu, Y., Bumbaca, D., ... Ayala, G. (2016). Antibody-Mediated Targeting of Tau In Vivo Does Not Require Effector Function and Microglial Engagement. *Cell Reports*, 16(6), 1690-1700. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.099>
- Lei, P., Ayton, S., Moon, S., Zhang, Q., Volitakis, I., Finkelstein, D. I., & Bush, A. I. (2014). Motor and cognitive deficits in aged tau knockout mice in two background strains. *Molecular Neurodegeneration*, 9, 29. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-29>
- Leroux, E., Perbet, R., Caillierez, R., Richetin, K., Lieger, S., Espourteille, J., Bouillet, T., Bégard, S., Danis, C., Loyens, A., Toni, N., Déglon, N., Deramecourt, V., Schraen-Maschke, S., Buée, L., & Colin, M. (2022). Extracellular vesicles : Major actors of heterogeneity in tau spreading among human tauopathies. *Molecular Therapy*, 30(2), 782-797. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.09.020>
- 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. *The American Journal of Pathology*, 171(3), 976-992. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070345>
- Li, C., Zhan, W., Yang, Z., Tu, C., Hu, G., Zhang, X., Song, W., Du, S., Zhu, Y., Huang, K., Kong, Y., Zhang, M., Mao, Q., Gu, X., Zhang, Y., Xie, Y., Deng, Q., Song, Y., Chen, Z., ... Ying, T. (2022). Broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by an inhalable bispecific single-domain antibody. *Cell*, 185(8), 1389-1401.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.009>
- Li, J., Deng, Y., Zhang, W., Zhou, A.-P., Guo, W., Yang, J., Yuan, Y., Zhu, L., Qin, S., Xiang, S., Lu, H., Gong, J., Xu, T., Liu, D., & Shen, L. (2021). Subcutaneous envafolimab monotherapy in patients with advanced defective mismatch repair/microsatellite instability high solid tumors. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01095-1>
- Li, T., & Paudel, H. K. (2006). Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry*, 45(10), 3125-3133. <https://doi.org/10.1021/bi051634r>

- Li, T., Vandesquille, M., Koukouli, F., Duffeffant, C., Youssef, I., Lenormand, P., Ganneau, C., Maskos, U., Czech, C., Grueninger, F., Duyckaerts, C., Dhenain, M., Bay, S., Delatour, B., & Lafaye, P. (2016). Camelid single-domain antibodies : A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *Journal of Controlled Release*, 243, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019>
- Li, X., Kumar, Y., Zempel, H., Mandelkow, E.-M., Biernat, J., & Mandelkow, E. (2011). Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 30(23), 4825-4837. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.376>
- Lim, S., Khoo, R., Peh, K. M., Teo, J., Chang, S. C., Ng, S., Beilhardt, G. L., Melnyk, R. A., Johannes, C. W., Brown, C. J., Lane, D. P., Henry, B., & Partridge, A. W. (2020). bioPROTACs as versatile modulators of intracellular therapeutic targets including proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(11), 5791-5800. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920251117>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), 10804-10809. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400348101>
- Liu, L., Tu, B., Sun, Y., Liao, L., Lu, X., Liu, E., & Huang, Y. (2025). Nanobody-based drug delivery systems for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 381, 113562. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.02.058>
- Liu, Z., Kim, D., Kang, S., & Jung, J. U. (2024). A Detailed Protocol for Constructing a Human Single-Chain Variable Fragment (scFv) Library and Downstream Screening via Phage Display. *Methods and Protocols*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/mps7010013>
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., & Binder, L. I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), 8422-8426. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.21.8422>
- Lope-Piedrafita, S. (2018). Diffusion Tensor Imaging (DTI). In *Preclinical MRI* (p. 103-116). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7531-0_7
- 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. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 45(1), 75-88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>
- Lujan, P., Garcia-Cabau, C., Wakana, Y., Vera Lillo, J., Rodilla-Ramírez, C., Sugiura, H., Malhotra, V., Salvatella, X., Garcia-Parajo, M. F., & Campelo, F. (2024). Sorting of secretory proteins at the trans-Golgi network by human TGN46. *eLife*, 12, RP91708. <https://doi.org/10.7554/eLife.91708>
- Luo, W., Liu, W., Hu, X., Hanna, M., Caravaca, A., & Paul, S. M. (2015). Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Scientific Reports*, 5, 11161. <https://doi.org/10.1038/srep11161>
- Ma, D., Cardoso, M. J., Modat, M., Powell, N., Wells, J., Holmes, H., Wiseman, F., Tybulewicz, V., Fisher, E., Lythgoe, M. F., & Ourselin, S. (2014). Automatic structural parcellation of mouse brain MRI

- using multi-atlas label fusion. *PloS One*, 9(1), e86576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086576>
- Ma, J., Mo, Y., Tang, M., Shen, J., Qi, Y., Zhao, W., Huang, Y., Xu, Y., & Qian, C. (2021). Bispecific Antibodies : From Research to Clinical Application. *Frontiers in Immunology*, 12, 626616. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626616>
- Ma, Q.-L., Zuo, X., Yang, F., Ubada, O. J., Gant, D. J., Alaverdyan, M., Kiose, N. C., Nazari, S., Chen, P. P., Nothias, F., Chan, P., Teng, E., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2014). Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water Maze with aging. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(21), 7124-7136. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3439-13.2014>
- Ma, Q.-L., Zuo, X., Yang, F., Ubada, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(6), 4056-4065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393751>
- Macdonald, J. A., Bronner, I. F., Drynan, L., Fan, J., Curry, A., Fraser, G., Lavenir, I., & Goedert, M. (2019). Assembly of transgenic human P301S Tau is necessary for neurodegeneration in murine spinal cord. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0695-5>
- Majumder, M., & Dutta, D. (2024). Oligodendrocyte Dysfunction in Tauopathy : A Less Explored Area in Tau-Mediated Neurodegeneration. *Cells*, 13(13), 1112. <https://doi.org/10.3390/cells13131112>
- Makrides, V., Shen, T. E., Bhatia, R., Smith, B. L., Thimm, J., Lal, R., & Feinstein, S. C. (2003). Microtubule-dependent oligomerization of tau. Implications for physiological tau function and tauopathies. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33298-33304. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305207200>
- Malaquias, A. D. M., Marques, L. E. C., Pereira, S. S., de Freitas Fernandes, C., Maranhão, A. Q., Stabeli, R. G., Florean, E. O. P. T., Guedes, M. I. F., & Fernandes, C. F. C. (2021). A review of plant-based expression systems as a platform for single-domain recombinant antibody production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 1130-1137. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.126>
- 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(4), 427. <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. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 54(1), 223-232. <https://doi.org/10.3233/JAD-160544>
- Manczak, M., & Reddy, P. H. (2012). Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons : Implications for

- mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Human Molecular Genetics*, 21(11), 2538-2547. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds072>
- Manjón, J. V., Coupé, P., Concha, L., Buades, A., Collins, D. L., & Robles, M. (2013). Diffusion weighted image denoising using overcomplete local PCA. *PloS One*, 8(9), e73021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073021>
- Manjón, J. V., Coupé, P., Martí-Bonmatí, L., Collins, D. L., & Robles, M. (2010). Adaptive non-local means denoising of MR images with spatially varying noise levels. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, 31(1), 192-203. <https://doi.org/10.1002/jmri.22003>
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V., Sultan, A., Violet, M., Chauderlier, A., Delattre, L., Loyens, A., Talahari, S., Bégard, S., Nessler, F., Colin, M., Souès, S., Lefebvre, B., Buée, L., Galas, M.-C., & Bonnefoy, E. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Scientific Reports*, 6(1), 33047. <https://doi.org/10.1038/srep33047>
- Marciniak, E., Leboucher, A., Caron, E., Ahmed, T., Talleux, A., Dumont, J., Issad, T., Gerhardt, E., Pagesy, P., Vilen, M., Bournonville, C., Hamdane, M., Bantubungi, K., Lancel, S., Demeyer, D., Eddarkaoui, S., Vallez, E., Vieau, D., Humez, S., ... Blum, D. (2017). Tau deletion promotes brain insulin resistance. *The Journal of Experimental Medicine*, 214(8), 2257-2269. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>
- Marrero-Winkens, C., Sankaran, C., & Schätzl, H. M. (2020). From Seeds to Fibrils and Back : Fragmentation as an Overlooked Step in the Propagation of Prions and Prion-Like Proteins. *Biomolecules*, 10(9), 1305. <https://doi.org/10.3390/biom10091305>
- Martenyi, F., Campbell, B., Kinney, G. G., Lee, J., Jin, Y., Zago, W. M., & Garren, H. (2023). PRX005, a novel anti-MTBR tau monoclonal antibody : Results from a first-in-human double-blind, placebo-controlled, single ascending dose phase 1 study. *Alzheimer's & Dementia*, 19(S21), e074181. <https://doi.org/10.1002/alz.074181>
- Marvian, A. T., Strauss, T., Tang, Q., Tuck, B. J., Keeling, S., Rüdiger, D., Mirzazadeh Dizaji, N., Mohammad-Beigi, H., Nuscher, B., Chakraborty, P., Sutherland, D. S., McEwan, W. A., Köglperger, T., Zahler, S., Zweckstetter, M., Lichtenthaler, S. F., Wurst, W., Schwarz, S., & Höglinger, G. (2024). Distinct regulation of Tau Monomer and aggregate uptake and intracellular accumulation in human neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 19(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s13024-024-00786-w>
- Mate De Gerando, A., Welikovitsh, L. A., Khasnavis, A., Commins, C., Glynn, C., Chun, J. E., Perbet, R., & Hyman, B. T. (2023). Tau seeding and spreading in vivo is supported by both AD-derived fibrillar and oligomeric tau. *Acta Neuropathologica*, 146(2), 191-210. <https://doi.org/10.1007/s00401-023-02600-1>
- Matsuzaki, Y., Kajiwara, K., Aoki, W., & Ueda, M. (2022). Production of Single-Domain Antibodies in *Pichia pastoris*. In *Single-Domain Antibodies* (p. 181-203). Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2075-5_9
- Maurage, C.-A., Sergeant, N., Ruchoux, M.-M., Hauw, J.-J., & Delacourte, A. (2003). Phosphorylated serine 199 of microtubule-associated protein tau is a neuronal epitope abundantly expressed in youth and an early marker of tau pathology. *Acta Neuropathologica*, 105(2), 89-97. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0608-7>

- McArthur, N., Kang, B., Rivera Moctezuma, F. G., Shaikh, A. T., Loeffler, K., Bhatt, N. N., Kidd, M., Zupancic, J. M., Desai, A. A., Djeddar, N., Bryksin, A., Tessier, P. M., Kaye, R., Wood, L. B., & Kane, R. S. (2024). Development of a pan-tau multivalent nanobody that binds tau aggregation motifs and recognizes pathological tau aggregates. *Biotechnology Progress*, 40(5), e3463. <https://doi.org/10.1002/btpr.3463>
- McArthur, N., Squire, J. D., Onyeachonam, O. J., Bhatt, N. N., Jerez, C., Holberton, A. L., Tessier, P. M., Wood, L. B., Kaye, R., & Kane, R. S. (2024). Generation of nanobodies with conformational specificity for tau oligomers that recognize tau aggregates from human Alzheimer's disease samples. *Biomaterials Science*, 12(23), 6033-6046. <https://doi.org/10.1039/d4bm00707g>
- McEwan, W. A., Falcon, B., Vaysburd, M., Clift, D., Oblak, A. L., Ghetti, B., Goedert, M., & James, L. C. (2017). Cytosolic Fc receptor TRIM21 inhibits seeded tau aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(3), 574-579. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607215114>
- McMahon, C., Baier, A. S., Pascolutti, R., Wegrecki, M., Zheng, S., Ong, J. X., Erlandson, S. C., Hilger, D., Rasmussen, S. G. F., Ring, A. M., Manglik, A., & Kruse, A. C. (2018). Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(3), 289-296. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0028-6>
- Means, J. C., Gerdes, B. C., Kaja, S., Sumien, N., Payne, A. J., Stark, D. A., Borden, P. K., Price, J. L., & Koulen, P. (2016). Caspase-3-Dependent Proteolytic Cleavage of Tau Causes Neurofibrillary Tangles and Results in Cognitive Impairment During Normal Aging. *Neurochemical Research*, 41(9), 2278-2288. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1942-9>
- Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., Kissel, J. T., Nagendran, S., L'Italien, J., Sproule, D. M., Wells, C., Cardenas, J. A., Heitzer, M. D., Kaspar, A., Corcoran, S., ... Kaspar, B. K. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *The New England Journal of Medicine*, 377(18), 1713-1722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>
- Mercken, M., Vandermeeren, M., Lübke, U., Six, J., Boons, J., Van de Voorde, A., Martin, J. J., & Gheuens, J. (1992). Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathologica*, 84(3), 265-272. <https://doi.org/10.1007/BF00227819>
- Meredith Jr., J. E., Sankaranarayanan, S., Guss, V., Lanzetti, A. J., Berisha, F., Neely, R. J., Slemmon, J. R., Portelius, E., Zetterberg, H., Blennow, K., Soares, H., Ahljiarian, M., & Albright, C. F. (2013). Characterization of Novel CSF Tau and ptau Biomarkers for Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 8(10), e76523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076523>
- Merezhko, M., Brunello, C. A., Yan, X., Vihinen, H., Jokitalo, E., Uronen, R.-L., & Huttunen, H. J. (2018). Secretion of Tau via an Unconventional Non-vesicular Mechanism. *Cell Reports*, 25(8), 2027-2035.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.078>
- Mesulam, M., Shaw, P., Mash, D., & Weintraub, S. (2004). Cholinergic nucleus basalis tauopathy emerges early in the aging-MCI-AD continuum. *Annals of Neurology*, 55(6), 815-828. <https://doi.org/10.1002/ana.20100>
- Michalak, M. (2023). Calreticulin : Endoplasmic reticulum Ca²⁺ gatekeeper. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 28(5), e17839. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17839>

- Miller, L. V. C., Papa, G., Vaysburd, M., Cheng, S., Sweeney, P. W., Smith, A., Franco, C., Katsinelos, T., Huang, M., Sanford, S. A. I., Benn, J., Farnsworth, J., Higginson, K., Joyner, H., McEwan, W. A., & James, L. C. (2024). Co-opting templated aggregation to degrade pathogenic tau assemblies and improve motor function. *Cell*, 187(21), 5967-5980.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.08.024>
- 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., ... Gan, L. (2015). Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nature Medicine*, 21(10), 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(6), 953-966. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.044>
- 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, e36584. <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>
- Mirbaha, H., Holmes, B. B., Sanders, D. W., Bieschke, J., & Diamond, M. I. (2015). Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(24), 14893-14903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652693>
- Miyamoto, K., Kowalska, A., Hasegawa, M., Tabira, T., Takahashi, K., Araki, W., Akiguchi, I., & Ikemoto, A. (2001). Familial frontotemporal dementia and parkinsonism with a novel mutation at an intron 10+11-splice site in the tau gene. *Annals of Neurology*, 50(1), 117-120. <https://doi.org/10.1002/ana.1083>
- Mohamed, N.-V., Desjardins, A., & Leclerc, N. (2017). Tau secretion is correlated to an increase of Golgi dynamics. *PLOS ONE*, 12(5), e0178288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178288>
- 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 32040-32053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>
- Monti, G., Vincke, C., Lunding, M., Jensen, A. M. G., Madsen, P., Muyldermans, S., Kjolby, M., & Andersen, O. M. (2023). Epitope mapping of nanobodies binding the Alzheimer's disease receptor SORLA. *Journal of Biotechnology*, 375, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2023.08.005>
- Morito, T., Qi, M., Kamano, N., Sasaguri, H., Bez, S., Foiani, M., Duff, K., Benner, S., Endo, T., Hama, H., Kurokawa, H., Miyawaki, A., Mizuma, H., Sahara, N., Shimojo, M., Higuchi, M., Saido, T. C., & Watamura, N. (2025). Human MAPT knockin mouse models of frontotemporal dementia for the neurodegenerative research community. *Cell Reports Methods*, 5(4), 101024. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2025.101024>
- Mortelecque, J., Zejneli, O., Bégard, S., Simões, M. C., ElHajjar, L., Nguyen, M., Cantrelle, F.-X., Hanouille, X., Rain, J.-C., Colin, M., Gomes, C. M., Buée, L., Landrieu, I., Danis, C., & Dupré, E. (2024). A

- selection and optimization strategy for single-domain antibodies targeting the PHF6 linear peptide within the tau intrinsically disordered protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 300(4), 107163. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107163>
- 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, e16228. <https://doi.org/10.7554/eLife.16228>
- Moutel, S., El Marjou, A., Vielemeyer, O., Nizak, C., Benaroch, P., Dübel, S., & Perez, F. (2009). A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnology*, 9(1), 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-14>
- Muhuri, M., Levy, D. I., Schulz, M., McCarty, D., & Gao, G. (2022). Durability of transgene expression after rAAV gene therapy. *Molecular Therapy*, 30(4), 1364-1380. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.03.004>
- Mukadam, A. S., Miller, L. V. C., Smith, A. E., Vaysburd, M., Sakya, S. A., Sanford, S., Keeling, S., Tuck, B. J., Katsinelos, T., Green, C., Skov, L., Kaalund, S. S., Foss, S., Mayes, K., O'Connell, K., Wing, M., Knox, C., Banbury, J., Avezov, E., ... McEwan, W. A. (2023). Cytosolic antibody receptor TRIM21 is required for effective tau immunotherapy in mouse models. *Science*, 379(6639), 1336-1341. <https://doi.org/10.1126/science.abn1366>
- Mummery, C. J., Börjesson-Hanson, A., Blackburn, D. J., Vijverberg, E. G. B., De Deyn, P. P., Ducharme, S., Jonsson, M., Schneider, A., Rinne, J. O., Ludolph, A. C., Bodenschatz, R., Kordasiewicz, H., Swayze, E. E., Fitzsimmons, B., Mignon, L., Moore, K. M., Yun, C., Baumann, T., Li, D., ... Lane, R. M. (2023). Tau-targeting antisense oligonucleotide MAPTRx in mild Alzheimer's disease : A phase 1b, randomized, placebo-controlled trial. *Nature Medicine*, 29(6), 1437-1447. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02326-3>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies : Natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 775-797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J. A. R. G., & Hamers, R. (1994). Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(9), 1129-1135. <https://doi.org/10.1093/protein/7.9.1129>
- Nabuurs, R. J. A., Rutgers, K. S., Welling, M. M., Metaxas, A., de Backer, M. E., Rotman, M., Bacskai, B. J., van Buchem, M. A., van der Maarel, S. M., & van der Weerd, L. (2012). In vivo detection of amyloid- β deposits using heavy chain antibody fragments in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *PloS One*, 7(6), e38284. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038284>
- Nair, S., Jiang, Y., Marchal, I. S., Chernobelsky, E., Huang, H.-W., Suh, S., Pan, R., Kong, X.-P., Ryoo, H. D., & Sigurdsson, E. M. (2024). Anti-tau single domain antibodies clear pathological tau and attenuate its toxicity and related functional defects. *Cell Death & Disease*, 15(7), 543. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06927-9>
- Narasimhan, S., Guo, J. L., Changolkar, L., Stieber, A., McBride, J. D., Silva, L. V., He, Z., Zhang, B., Gathagan, R. J., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2017). Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *The Journal of Neuroscience*, 37(47), 11406-11423. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1230-17.2017>

- Neddens, J., Temmel, M., Flunkert, S., Kerschbaumer, B., Hoeller, C., Loeffler, T., Niederkofler, V., Daum, G., Attems, J., & Hutter-Paier, B. (2018). Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0557-6>
- Nelson, P. T., Jicha, G. A., Schmitt, F. A., Liu, H., Davis, D. G., Mendiando, M. S., Abner, E. L., & Markesbery, W. R. (2007). Clinicopathologic Correlations in a Large Alzheimer Disease Center Autopsy Cohort : Neuritic Plaques and Neurofibrillary Tangles "Do Count" When Staging Disease Severity. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 66(12), 1136. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31815c5efb>
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C. M., McCluskey, L. F., Miller, B. L., Masliah, E., Mackenzie, I. R., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H. A., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science*, 314(5796), 130-133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M., & Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Research*, 387(3), 271-280. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(86\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0169-328x(86)90033-1)
- Ng, A. S. L., Tan, Y. J., Lu, Z., Ng, E. Y., Ng, S. Y. E., Chia, N. S. Y., Setiawan, F., Xu, Z., Keong, N. C. H., Tay, K. Y., Au, W. L., Tan, L. C. S., & Tan, E.-K. (2020). Plasma ubiquitin C-terminal hydrolase L1 levels reflect disease stage and motor severity in Parkinson's disease. *Aging (Albany NY)*, 12(2), 1488-1495. <https://doi.org/10.18632/aging.102695>
- Nishimura, M., Namba, Y., Ikeda, K., & Oda, M. (1992). Glial fibrillary tangles with straight tubules in the brains of patients with progressive supranuclear palsy. *Neuroscience Letters*, 143(1-2), 35-38. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90227-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90227-x)
- Noble, W., Garwood, C., Stephenson, J., Kinsey, A. M., Hanger, D. P., & Anderton, B. H. (2009). Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(3), 739-750. <https://doi.org/10.1096/fj.08-113795>
- Noguchi, Y., Kato, M., Ozeki, K., & Ishigai, M. (2017). Pharmacokinetics of an intracerebroventricularly administered antibody in rats. *mAbs*, 9(7), 1210-1215. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1345834>
- Novak, P., Kovacech, B., Katina, S., Schmidt, R., Scheltens, P., Kontsekkova, E., Ropele, S., Fialova, L., Kramberger, M., Paulenka-Ivanovova, N., Smisek, M., Hanes, J., Stevens, E., Kovac, A., Sutovsky, S., Parrak, V., Koson, P., Prcina, M., Galba, J., ... Zilka, N. (2021). ADAMANT : A placebo-controlled randomized phase 2 study of AADvac1, an active immunotherapy against pathological tau in Alzheimer's disease. *Nature Aging*, 1(6), 521-534. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00070-2>
- Oblinger, M., Argasinski, A., Wong, J., & Kosik, K. (1991). Tau gene expression in rat sensory neurons during development and regeneration. *The Journal of Neuroscience*, 11(8), 2453-2459. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.11-08-02453.1991>
- Olesen, M. A., Villavicencio-Tejo, F., Johnson, G. V. W., Porter, G. A., & Quintanilla, R. A. (2025). Cyclophilin D (CypD) ablation prevents neurodegeneration and cognitive damage induced by

- caspase-3 cleaved tau. *Free Radical Biology & Medicine*, 232, 128-141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2025.02.035>
- Olfati, N., Shoeibi, A., & Litvan, I. (2022). Clinical Spectrum of Tauopathies. *Frontiers in Neurology*, 13, 944806. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.944806>
- Olichon, A., & de Marco, A. (2012). Preparation of a naïve library of camelid single domain antibodies. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 911, 65-78. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_5
- Oosterlynck, M., Fichter, L., Leroux, E., Eddarkaoui, S., Bouillet, T., Lefebvre, C., Nguyen, M., Maurage, C.-A., Accart, B., Dupré, E., Landrieu, I., Danis, C., Lehmann, S., Vialaret, J., Buée, L., Hirtz, C., & Colin, M. (2025). *Tau Profiling of Brain Extracellular Vesicles Reveals PHF6 Peptide as Core for Pathological Tau Seeding in Alzheimer's Disease*.
- Osaki, T., Nakanishi, T., Aoki, M., Omizu, T., Nishiura, D., & Kitamura, M. (2018). Soluble Expression in *Escherichia coli* of a Single-Domain Antibody-Tumor Necrosis Factor α Fusion Protein Specific for Epidermal Growth Factor Receptor. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 37(1), 20-25. <https://doi.org/10.1089/mab.2017.0051>
- Othman, M. Z., Hassan, Z., & Che Has, A. T. (2022). Morris water maze : A versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory. *Experimental Animals*, 71(3), 264-280. <https://doi.org/10.1538/expanim.21-0120>
- Pansieri, J., Plissonneau, M., Stransky-Heilkron, N., Dumoulin, M., Heinrich-Balard, L., Rivory, P., Morfin, J.-F., Toth, E., Saraiva, M. J., Allémann, E., Tillement, O., Forge, V., Lux, F., & Marquette, C. (2017). Multimodal imaging Gd-nanoparticles functionalized with Pittsburgh compound B or a nanobody for amyloid plaques targeting. *Nanomedicine (London, England)*, 12(14), 1675-1687. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0079>
- Papadopoulos, K. P., Harb, W., Lu, N., Ma, X., He, Y., Yuan, L., Fu, M., Lin, Y., Xu, W., Wang, X., Wang, P., Xu, T., Dong, R., & Gong, J. (2018). 1140PD - Phase I study of KN035, a novel fusion Anti-PD-L1 antibody administered subcutaneously in patients with advanced solid tumors in the USA. *Annals of Oncology*, 29, viii405. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy288.013>
- Park, Y., KC, N., Paneque, A., & Cole, P. D. (2024). Tau, Glial Fibrillary Acidic Protein, and Neurofilament Light Chain as Brain Protein Biomarkers in Cerebrospinal Fluid and Blood for Diagnosis of Neurobiological Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6295. <https://doi.org/10.3390/ijms25126295>
- Parra Bravo, C., Naguib, S. A., & Gan, L. (2024). Cellular and pathological functions of tau. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-20. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00753-9>
- Paspalas, C. D., Carlyle, B. C., Leslie, S., Preuss, T. M., Crimins, J. L., Huttner, A. J., van Dyck, C. H., Rosene, D. L., Nairn, A. C., & Arnsten, A. F. T. (2018). The aged rhesus macaque manifests Braak stage III/IV Alzheimer's-like pathology. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(5), 680-691. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.11.005>
- Paul, C.-M., Magda, G., & Abel, S. (2009). Spatial memory : Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 203(2), 151-164. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.05.022>

- Peeraer, E., Bottelbergs, A., Van Kolen, K., Stancu, I.-C., Vasconcelos, B., Mahieu, M., Duytschaever, H., Ver Donck, L., Torremans, A., Sluydts, E., Van Acker, N., Kemp, J. A., Mercken, M., Brunden, K. R., Trojanowski, J. Q., Dewachter, I., Lee, V. M. Y., & Moechars, D. (2015). Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 73, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.032>
- Permanne, B., Sand, A., Ousson, S., Nény, M., Hantson, J., Schubert, R., Wiessner, C., Quattropiani, A., & Beher, D. (2022). O-GlcNAcase Inhibitor ASN90 is a Multimodal Drug Candidate for Tau and α -Synuclein Proteinopathies. *ACS Chemical Neuroscience*, 13(8), 1296-1314. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.2c00057>
- Peyvandi, F., Scully, M., Kremer Hovinga, J. A., Cataland, S., Knöbl, P., Wu, H., Artoni, A., Westwood, J.-P., Mansouri Taleghani, M., Jilma, B., Callewaert, F., Ulrichs, H., Duby, C., Tersago, D., & TITAN Investigators. (2016). Caplacizumab for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *The New England Journal of Medicine*, 374(6), 511-522. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505533>
- Poduslo, J. F., Curran, G. L., & Berg, C. T. (1994). Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5705-5709. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5705>
- Polanco, J. C., Scicluna, B. J., Hill, A. F., & Götz, J. (2016). Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12445-12466. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709485>
- Polydoro, M., Dzhala, V. I., Pooler, A. M., Nicholls, S. B., McKinney, A. P., Sanchez, L., Pitstick, R., Carlson, G. A., Staley, K. J., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathologica*, 127(2), 257-270. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1215-5>
- Pooler, A. M., Phillips, E. C., Lau, D. H. W., Noble, W., & Hanger, D. P. (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Reports*, 14(4), 389. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.15>
- Pooler, A. M., Usardi, A., Evans, C. J., Philpott, K. L., Noble, W., & Hanger, D. P. (2012). Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiology of Aging*, 33(2), 431.e27-38. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.01.005>
- Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M., & Schellenberg, G. D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Annals of Neurology*, 43(6), 815-825. <https://doi.org/10.1002/ana.410430617>
- Price, D. L., & Sisodia, S. S. (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annual Review of Neuroscience*, 21, 479-505. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.479>
- Prusiner, S. B. (1982). Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J., & Cohen, F. E. (1998). Prion Protein Biology. *Cell*, 93(3), 337-348. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81163-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81163-0)

- Qiao, L., Hu, J., Qiu, X., Wang, C., Peng, J., Zhang, C., Zhang, M., Lu, H., & Chen, W. (2023). LAMP2A, LAMP2B and LAMP2C : Similar structures, divergent roles. *Autophagy*, 19(11), 2837-2852. <https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2235196>
- Qiu, C., Albayram, O., Kondo, A., Wang, B., Kim, N., Arai, K., Tsai, C.-Y., Bassal, M. A., Herbert, M. K., Washida, K., Angeli, P., Kozono, S., Stucky, J. E., Baxley, S., Lin, Y.-M., Sun, Y., Rotenberg, A., Caldarone, B. J., Bigio, E. H., ... Lu, K. P. (2021). Cis P-tau underlies vascular contribution to cognitive impairment and dementia and can be effectively targeted by immunotherapy in mice. *Science Translational Medicine*, 13(596), eaaz7615. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz7615>
- Queiroz Zetune Villa Real, K., Mougios, N., Rehm, R., Sograte-Idrissi, S., Albert, L., Rahimi, A. M., Maidorn, M., Hentze, J., Martínez-Carranza, M., Hosseini, H., Saal, K.-A., Oleksiievets, N., Prigge, M., Tsukanov, R., Stenmark, P., Fornasiero, E. F., & Opazo, F. (s. d.). A Versatile Synaptotagmin-1 Nanobody Provides Perturbation-Free Live Synaptic Imaging And Low Linkage-Error in Super-Resolution Microscopy. *Small Methods*, n/a(n/a), 2300218. <https://doi.org/10.1002/smt.202300218>
- Radford, R. A. W., Rayner, S. L., Szwaja, P., Morsch, M., Cheng, F., Zhu, T., Widagdo, J., Anggono, V., Pountney, D. L., Chung, R., & Lee, A. (2023). Identification of phosphorylated tau protein interactors in progressive supranuclear palsy (PSP) reveals networks involved in protein degradation, stress response, cytoskeletal dynamics, metabolic processes, and neurotransmission. *Journal of Neurochemistry*, 165(4), 563-586. <https://doi.org/10.1111/jnc.15796>
- Rane, J. S., Bhaumik, P., & Panda, D. (2017). Curcumin Inhibits Tau Aggregation and Disintegrates Preformed Tau Filaments in vitro. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 60(3), 999-1014. <https://doi.org/10.3233/JAD-170351>
- Rasmussen, S. 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 $\beta(2)$ adrenoceptor. *Nature*, 469(7329), 175-180. <https://doi.org/10.1038/nature09648>
- Rath, T., Baker, K., Dumont, J. A., Peters, R. T., Jiang, H., Qiao, S.-W., Lencer, W. I., Pierce, G. F., & Blumberg, R. S. (2015). Fc-fusion proteins and FcRn : Structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 235-254. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.834293>
- Rauch, J. N., Chen, J. J., Sorum, A. W., Miller, G. M., Sharf, T., See, S. K., Hsieh-Wilson, L. C., Kampmann, M., & Kosik, K. S. (2018). Tau Internalization is Regulated by 6-O Sulfation on Heparan Sulfate Proteoglycans (HSPGs). *Scientific Reports*, 8(1), 6382. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24904-z>
- Rauch, J. N., Luna, G., Guzman, E., Audouard, M., Challis, C., Sibih, Y. E., Leshuk, C., Hernandez, I., Wegmann, S., Hyman, B. T., Gradinaru, V., Kampmann, M., & Kosik, K. S. (2020). LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature*, 580(7803), 381-385. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2156-5>
- Ren, C., Zoltewicz, S., Guingab-Cagmat, J., Anagli, J., Gao, M., Hafeez, A., Li, N., Cao, J., Geng, X., Kobeissy, F., Mondello, S., Lerner, S. F., Hayes, R. L., Ji, X., & Ding, Y. (2013). Different expression of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 and α -spectrin in ischemic and hemorrhagic stroke :

- Potential biomarkers in diagnosis. *Brain Research*, 1540, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.09.051>
- Reynolds, C. H., Garwood, C. J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P. W., Varndell, I. M., Hanger, D. P., & Anderton, B. H. (2008). Phosphorylation Regulates Tau Interactions with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase Cy1, Grb2, and Src Family Kinases*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 18177-18186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709715200>
- Rico, T., Denechaud, M., Caillierez, R., Comptdaer, T., Adriaenssens, E., Buée, L., & Lefebvre, B. (2022). Cancer Cells Upregulate Tau to Gain Resistance to DNA Damaging Agents. *Cancers*, 15(1), 116. <https://doi.org/10.3390/cancers15010116>
- Rico, T., Gilles, M., Chauderlier, A., Comptdaer, T., Magnez, R., Chwastyniak, M., Drobecq, H., Pinet, F., Thuru, X., Buée, L., Galas, M.-C., & Lefebvre, B. (2021). Tau Stabilizes Chromatin Compaction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.740550>
- Rizzi, L., & Grinberg, L. T. (2024). Exploring the significance of caspase-cleaved tau in tauopathies and as a complementary pathology to phospho-tau in Alzheimer's disease : Implications for biomarker development and therapeutic targeting. *Acta Neuropathologica Communications*, 12, 36. <https://doi.org/10.1186/s40478-024-01744-9>
- Roberts, M., Sevastou, I., Imaizumi, Y., Mistry, K., Talma, S., Dey, M., Gartlon, J., Ochiai, H., Zhou, Z., Akasofu, S., Tokuhara, N., Ogo, M., Aoyama, M., Aoyagi, H., Strand, K., Sajedi, E., Agarwala, K. L., Spidel, J., Albone, E., ... de Silva, R. (2020). Pre-clinical characterisation of E2814, a high-affinity antibody targeting the microtubule-binding repeat domain of tau for passive immunotherapy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0884-2>
- Rodriguez, L., Mohamed, N.-V., Desjardins, A., Lippé, R., Fon, E. A., & Leclerc, N. (2017). Rab7A regulates tau secretion. *Journal of Neurochemistry*, 141(4), 592-605. <https://doi.org/10.1111/jnc.13994>
- Rosenqvist, N., Asuni, A. A., Andersson, C. R., Christensen, S., Daechsel, J. A., Egebjerg, J., Falsig, J., Helboe, L., Jul, P., Kartberg, F., Pedersen, L. Ø., Sigurdsson, E. M., Sotty, F., Skjød, K., Stavenhagen, J. B., Volbracht, C., & Pedersen, J. T. (2018). Highly specific and selective anti-pS396-tau antibody C10.2 targets seeding-competent tau. *Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.)*, 4, 521-534. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.09.005>
- Rossotti, M. A., Bélanger, K., Henry, K. A., & Tanha, J. (2022). Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies. *The FEBS Journal*, 289(14), 4304-4327. <https://doi.org/10.1111/febs.15809>
- Rotman, M., Welling, M. M., van den Boogaard, M. L., Moursel, L. G., van der Graaf, L. M., van Buchem, M. A., van der Maarel, S. M., & van der Weerd, L. (2015). Fusion of hlgG1-Fc to 111In-anti-amyloid single domain antibody fragment VHH-pa2H prolongs blood residential time in APP/PS1 mice but does not increase brain uptake. *Nuclear Medicine and Biology*, 42(8), 695-702. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.03.003>
- Ruan, Z., Pathak, D., Venkatesan Kalavai, S., Yoshii-Kitahara, A., Muraoka, S., Bhatt, N., Takamatsu-Yukawa, K., Hu, J., Wang, Y., Hersh, S., Ericsson, M., Gorantla, S., Gendelman, H. E., Kaye, R., Ikezu, S., Luebeck, J. I., & Ikezu, T. (2021). Alzheimer's disease brain-derived extracellular

- vesicles spread tau pathology in interneurons. *Brain*, 144(1), 288-309. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa376>
- 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>
- Sabir, J. S. M., Atef, A., El-Domyati, F. M., Edris, S., Hajrah, N., Alzohairy, A. M., & Bahieldin, A. (2014). Construction of naïve camelids VHH repertoire in phage display-based library. *Comptes Rendus Biologies*, 337(4), 244-249. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.02.004>
- 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. *Journal of Molecular Biology*, 352(3), 597-607. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.038>
- Saito, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Sasaguri, H., Hashimoto, S., Narasimhan, S., Zhang, B., Murayama, S., Higuchi, M., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., & Saido, T. C. (2019). Humanization of the entire murine Mapt gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(34), 12754-12765. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009487>
- 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. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 63(9), 911-918. <https://doi.org/10.1093/jnen/63.9.911>
- Salama, M., El-Desouky, S., Alsayed, A., El-Hussiny, M., Magdy, K., Fekry, E., Shabka, O., El-khodery, S. A., Youssef, M. A., Sobh, M., & Mohamed, W. (2019). siRNA Blocking of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Attenuates Pathology in Annonacin-Induced Tauopathy in Mice. *Neurotoxicity Research*, 35(4), 987-992. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9974-3>
- Sanders, D. W., Kaufman, S. K., DeVos, S. L., Sharma, A. M., Mirbaha, H., Li, A., Barker, S. J., Foley, A. C., Thorpe, J. R., Serpell, L. C., Miller, T. M., Grinberg, L. T., Seeley, W. W., & Diamond, M. I. (2014). Distinct Tau Prion Strains Propagate in Cells and Mice and Define Different Tauopathies. *Neuron*, 82(6), 1271-1288. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>
- Sayas, C. L., Medina, M., Cuadros, R., Ollá, I., García, E., Pérez, M., Ferrer, I., Hernández, F., & Avila, J. (2019). Role of tau N-terminal motif in the secretion of human tau by End Binding proteins. *PLoS ONE*, 14(1), e0210864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210864>
- Schenck, S., Kunz, L., Sahlender, D., Pardon, E., Geertsma, E. R., Savtchouk, I., Suzuki, T., Neldner, Y., Štefanić, S., Steyaert, J., Volterra, A., & Dutzler, R. (2017). Generation and Characterization of Anti-VGLUT Nanobodies Acting as Inhibitors of Transport. *Biochemistry*, 56(30), 3962-3971. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00436>
- 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. *The American Journal of Pathology*, 169(2), 599-616. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060002>

- Schmitz, K. R., Bagchi, A., Roovers, R. C., van Bergen en Henegouwen, P. M. P., & Ferguson, K. M. (2013). Structural evaluation of EGFR inhibition mechanisms for nanobodies/VHH domains. *Structure (London, England: 1993)*, 21(7), 1214-1224. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.008>
- Schoch, K. M., & Miller, T. M. (2017). Antisense oligonucleotides : Translation from mouse models to human neurodegenerative diseases. *Neuron*, 94(6), 1056-1070. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.010>
- Schoonhoven, D. N., Coomans, E. M., Millán, A. P., van Nifterick, A. M., Visser, D., Ossenkoppele, R., Tuncel, H., van der Flier, W. M., Golla, S. S. V., Scheltens, P., Hillebrand, A., van Berckel, B. N. M., Stam, C. J., & Gouw, A. A. (2023). Tau protein spreads through functionally connected neurons in Alzheimer's disease : A combined MEG/PET study. *Brain*, 146(10), 4040-4054. <https://doi.org/10.1093/brain/awad189>
- Scully, M., Cataland, S. R., Peyvandi, F., Coppo, P., Knöbl, P., Kremer Hovinga, J. A., Metjian, A., de la Rubia, J., Pavenski, K., Callewaert, F., Biswas, D., De Winter, H., Zeldin, R. K., & HERCULES Investigators. (2019). Caplacizumab Treatment for Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *The New England Journal of Medicine*, 380(4), 335-346. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1806311>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 96, 52434. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E.-M., Song, Y.-H., & Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *The EMBO Journal*, 21(18), 4896-4905. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf503>
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., Grognet, P., Bombois, S., Blum, D., Delacourte, A., Pasquier, F., Vanmechelen, E., Schraen-Maschke, S., & Buée, L. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Review of Proteomics*, 5(2), 207-224. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.2.207>
- Shah, N., Chari, A., Scott, E., Mezzi, K., & Usmani, S. Z. (2020). B-cell maturation antigen (BCMA) in multiple myeloma : Rationale for targeting and current therapeutic approaches. *Leukemia*, 34(4), 985-1005. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0734-z>
- Shi, Y., Zhang, W., Yang, Y., Murzin, A. G., Falcon, B., Kotecha, A., Van Beers, M., Tarutani, A., Kametani, F., Garringer, H. J., Vidal, R., Hallinan, G. I., Lashley, T., Saito, Y., Murayama, S., Yoshida, M., Tanaka, H., Kakita, A., Ikeuchi, T., ... Scheres, S. H. W. (2021). Structure-based classification of tauopathies. *Nature*, 598(7880), 359-363. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03911-7>
- Shin, M.-K., Vázquez-Rosa, E., Koh, Y., Dhar, M., Chaubey, K., Cintrón-Pérez, C. J., Barker, S., Miller, E., Franke, K., Noterman, M. F., Seth, D., Allen, R. S., Motz, C. T., Rao, S. R., Skelton, L. A., Pardue, M. T., Fliesler, S. J., Wang, C., Tracy, T. E., ... Pieper, A. A. (2021). Reducing acetylated tau is neuroprotective in brain injury. *Cell*, 184(10), 2715-2732.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.032>
- Sigala, J., Jumeau, F., Caillet-Boudin, M.-L., Sergeant, N., Ballot, C., Rigot, J.-M., Marcelli, F., Tardivel, M., Buée, L., & Mitchell, V. (2014). Immunodetection of Tau microtubule-associated protein in human sperm and testis. *Asian Journal of Andrology*, 16(6), 927-928. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.136446>

- Simón, D., García-García, E., Royo, F., Falcón-Pérez, J. M., & Avila, J. (2012). Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Letters*, 586(1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.022>
- Sohn, P. D., Tracy, T. E., Son, H.-I., Zhou, Y., Leite, R. E. P., Miller, B. L., Seeley, W. W., Grinberg, L. T., & Gan, L. (2016). Acetylated tau destabilizes the cytoskeleton in the axon initial segment and is mislocalized to the somatodendritic compartment. *Molecular Neurodegeneration*, 11, 47. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0109-0>
- Song, H.-L., Kim, N.-Y., Park, J., Kim, M. I., Jeon, Y.-N., Lee, S.-J., Cho, K., Shim, Y.-L., Lee, K.-H., Mun, Y.-S., Song, J.-A., Kim, M.-S., Pack, C.-G., Jung, M., Jang, H., Na, D. L., Hong, M., Kim, D.-H., & Yoon, S.-Y. (2023). Monoclonal antibody Y01 prevents tauopathy progression induced by lysine 280-acetylated tau in cell and mouse models. *The Journal of Clinical Investigation*, 133(8), e156537. <https://doi.org/10.1172/JCI156537>
- Sotiropoulos, I., Lopes, A. T., Pinto, V., Lopes, S., Carlos, S., Duarte-Silva, S., Neves-Carvalho, A., Pinto-Ribeiro, F., Pinheiro, S., Fernandes, R., Almeida, A., Sousa, N., & Leite-Almeida, H. (2014). Selective impact of Tau loss on nociceptive primary afferents and pain sensation. *Experimental Neurology*, 261, 486-493. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.07.008>
- Spencer, B., Brüscheiler, 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 Neuropathologica*, 136(1), 69-87. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1869-0>
- Spillantini, M. G., Goedert, M., Crowther, R. A., Murrell, J. R., Farlow, M. R., & Ghetti, B. (1997). Familial multiple system tauopathy with presenile dementia : A disease with abundant neuronal and glial tau filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 4113. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.4113>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839-840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Spinelli, S., Frenken, L., Bourgeois, D., Ron, L. de, Bos, W., Verrips, T., Anguille, C., Cambillau, C., & Tegoni, M. (1996). The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. *Nature Structural Biology*, 3(9), 752-757. <https://doi.org/10.1038/nsb0996-752>
- Spinelli, S., Frenken, L. G., Hermans, P., Verrips, T., Brown, K., Tegoni, M., & Cambillau, C. (2000). Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry*, 39(6), 1217-1222. <https://doi.org/10.1021/bi991830w>
- Stancu, I.-C., Vasconcelos, B., Ris, L., Wang, P., Villers, A., Peeraer, E., Buist, A., Terwel, D., Baatsen, P., Oyelami, T., Pierrot, N., Casteels, C., Bormans, G., Kienlen-Campard, P., Octave, J.-N., Moechars, D., & Dewachter, I. (2015). Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 875-894. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1413-4>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(27), 10826-10840. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.000378>

- Sud, R., Geller, E. T., & Schellenberg, G. D. (2014). Antisense-mediated Exon Skipping Decreases Tau Protein Expression : A Potential Therapy For Tauopathies. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 3(7), e180. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.30>
- 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4566-4575. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>
- Tacik, P., DeTure, M., Hinkle, K. M., Lin, W.-L., Sanchez-Contreras, M., Carlomagno, Y., Pedraza, O., Rademakers, R., Ross, O. A., Wszolek, Z. K., & Dickson, D. W. (2015). A Novel Tau Mutation in Exon 12, p.Q336H, Causes Hereditary Pick Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 74(11), 1042-1052. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000248>
- Tai, H.-C., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M. P., Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (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), 1426-1435. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.033>
- Takahashi, D., Moriyama, J., Nakamura, T., Miki, E., Takahashi, E., Sato, A., Akaike, T., Itto-Nakama, K., & Arimoto, H. (2019). AUTACs : Cargo-Specific Degradors Using Selective Autophagy. *Molecular Cell*, 76(5), 797-810.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.009>
- Taleghany, N., & Oblinger, M. M. (1992). Regional distribution and biochemical characteristics of high molecular weight tau in the nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 33(2), 257-265. <https://doi.org/10.1002/jnr.490330209>
- Tanaka, Y. (2023). Ozoralizumab : First Nanobody® therapeutic for rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 23(7), 579-587. <https://doi.org/10.1080/14712598.2023.2231344>
- Tapia-Monsalves, C., Olesen, M. A., Villavicencio-Tejo, F., & Quintanilla, R. A. (2023). Cyclosporine A (CsA) prevents synaptic impairment caused by truncated tau by caspase-3. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 125, 103861. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2023.103861>
- 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 Neuropathologica Communications*, 4(1), 117. <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(12), 2797-2801. <https://doi.org/10.1097/00001756-199708180-00029>
- Terry, R. D. (1963). The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease*†‡. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 22(4), 629-642. <https://doi.org/10.1097/00005072-196310000-00005>
- Teunissen, C. E., Kolster, R., Triana-Baltzer, G., Janelidze, S., Zetterberg, H., & Kolb, H. C. (2025). Plasma p-tau immunoassays in clinical research for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 21(1), e14397. <https://doi.org/10.1002/alz.14397>

- Thomas, S. N., Funk, K. E., Wan, Y., Liao, Z., Davies, P., Kuret, J., & Yang, A. J. (2012). Dual modification of Alzheimer's disease PHF-tau protein by lysine methylation and ubiquitylation : A mass spectrometry approach. *Acta Neuropathologica*, 123(1), 105-117. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0893-0>
- Tiernan, C. T., Combs, B., Cox, K., Morfini, G., Brady, S. T., Counts, S. E., & Kanaan, N. M. (2016). Pseudophosphorylation of tau at S422 enhances SDS-stable dimer formation and impairs both anterograde and retrograde fast axonal transport. *Experimental Neurology*, 283(Pt A), 318-329. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.030>
- Toledo, J. B., Xie, S. X., Trojanowski, J. Q., & Shaw, L. M. (2013). Longitudinal change in CSF Tau and A β biomarkers for up to 48 months in ADNI. *Acta neuropathologica*, 126(5), 10.1007/s00401-013-1151-1154. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1151-4>
- Tomlinson, B. E., Blessed, G., & Roth, M. (1970). Observations on the brains of demented old people. *Journal of the Neurological Sciences*, 11(3), 205-242. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(70\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(70)90063-8)
- Trabzuni, D., Wray, S., Vandrovcova, J., Ramasamy, A., Walker, R., Smith, C., Luk, C., Gibbs, J. R., Dillman, A., Hernandez, D. G., Arepalli, S., Singleton, A. B., Cookson, M. R., Pittman, A. M., de Silva, R., Weale, M. E., Hardy, J., & Ryten, M. (2012). MAPT expression and splicing is differentially regulated by brain region : Relation to genotype and implication for tauopathies. *Human Molecular Genetics*, 21(18), 4094-4103. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds238>
- Tracy, T. E., Madero-Pérez, J., Swaney, D. L., Chang, T. S., Moritz, M., Konrad, C., Ward, M. E., Stevenson, E., Hüttenhain, R., Kauwe, G., Mercedes, M., Sweetland-Martin, L., Chen, X., Mok, S.-A., Wong, M. Y., Telpoukhovskaia, M., Min, S.-W., Wang, C., Dongmin Sohn, P., ... Gan, L. (2022). Tau interactome maps synaptic and mitochondrial processes associated with neurodegeneration. *Cell*, 185(4), 712-728.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.041>
- Tracy, T. E., Sohn, P. D., Minami, S. S., Wang, C., Min, S.-W., Li, Y., Zhou, Y., Le, D., Lo, I., Ponnusamy, R., Cong, X., Schilling, B., Ellerby, L. M., Haganir, R. L., & Gan, L. (2016). Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss. *Neuron*, 90(2), 245-260. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.005>
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 6(12), 1887-1902.
- Trofimenko, E., Homma, Y., Fukuda, M., & Widmann, C. (2021). The endocytic pathway taken by cationic substances requires Rab14 but not Rab5 and Rab7. *Cell Reports*, 37(5), 109945. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109945>
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E. C., & Mandel, J. L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature Genetics*, 10(1), 104-110. <https://doi.org/10.1038/ng0595-104>
- Tustison, N. J., Avants, B. B., Cook, P. A., Zheng, Y., Egan, A., Yushkevich, P. A., & Gee, J. C. (2010). N4ITK : Improved N3 bias correction. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 29(6), 1310-1320. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2046908>

- Ulrichs, H., Silence, K., Schoolmeester, A., de Jaegere, P., Rossenu, S., Roodt, J., Priem, S., Lauwereys, M., Casteels, P., Van Bockstaele, F., Verschueren, K., Stanssens, P., Baumeister, J., & Holz, J.-B. (2011). Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*, 118(3), 757-765. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-317859>
- Unger, M., Eichhoff, A. M., Schumacher, L., Stryio, M., Menzel, S., Schwan, C., Alzogaray, V., Zylberman, V., Seman, M., Brandner, J., Rohde, H., Zhu, K., Haag, F., Mittrücker, H.-W., Goldbaum, F., Aktories, K., & Koch-Nolte, F. (2015). Selection of nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary *Clostridium difficile* toxin CDT. *Scientific Reports*, 5, 7850. <https://doi.org/10.1038/srep07850>
- 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. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1431(1), 37-46. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00030-8](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00030-8)
- Van Roy, M., Ververken, C., Beirnaert, E., Hoefman, S., Kolkman, J., Vierboom, M., Breedveld, E., 't Hart, B., Poelmans, S., Bontinck, L., Hemeryck, A., Jacobs, S., Baumeister, J., & Ulrichs, H. (2015). The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0651-0>
- Vandesquille, M., Li, T., Po, C., Ganneau, C., Lenormand, P., Duffeffant, C., Czech, C., Grueninger, F., Duyckaerts, C., Delatour, B., Dhenain, M., Lafaye, P., & Bay, S. (2017). Chemically-defined camelid antibody bioconjugate for the magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. *mAbs*, 9(6), 1016-1027. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1342914>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13888-13893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009038107>
- Vemula, P., Schoch, K. M., & Miller, T. M. (2023). Evaluating the efficacy of purchased antisense oligonucleotides to reduce mouse and human tau in vivo. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1320182. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1320182>
- Verny, M., Duyckaerts, C., Agid, Y., & Hauw, J.-J. (1996). The significance of cortical pathology in progressive supranuclear palsy: Clinico-pathological data in 10 cases. *Brain*, 119(4), 1123-1136. <https://doi.org/10.1093/brain/119.4.1123>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispen, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes : From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Vincke, C., Loris, R., Saerens, D., Martinez-Rodriguez, S., Muyldermans, S., & Conrath, K. (2009). General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3273-3284. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806889200>
- Violet, M., Delattre, L., Tardivel, M., Sultan, A., Chauderlier, A., Caillierez, R., Talahari, S., Nesslany, F., Lefebvre, B., Bonnefoy, E., Buee, L., & Galas, M.-C. (2014). A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>

- Viswanathan, G. K., Shwartz, D., Losev, Y., Arad, E., Shemesh, C., Pichinuk, E., Engel, H., Raveh, A., Jelinek, R., Cooper, I., Gosselet, F., Gazit, E., & Segal, D. (2020). Purpurin modulates Tau-derived VQIVYK fibrillization and ameliorates Alzheimer's disease-like symptoms in animal model. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 77(14), 2795-2813. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03312-0>
- Vitale, F., Giliberto, L., Ruiz, S., Steslow, K., Marambaud, P., & d'Abramo, C. (2018). Anti-tau conformational scFv MC1 antibody efficiently reduces pathological tau species in adult JNPL3 mice. *Acta Neuropathologica Communications*, 6, 82. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0585-2>
- Vitale, F., Ortolan, J., Volpe, B. T., Marambaud, P., Giliberto, L., & d'Abramo, C. (2020). Intramuscular injection of vectorized-scFvMC1 reduces pathological tau in two different tau transgenic models. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01003-7>
- Vivash, L., Malpas, C. B., Meletis, C., Gollant, M., Eratne, D., Li, Q.-X., McDonald, S., O'Brien, W. T., Brodtmann, A., Darby, D., Kyndt, C., Walterfang, M., Hovens, C. M., Velakoulis, D., & O'Brien, T. J. (2022). A phase 1b open-label study of sodium selenate as a disease-modifying treatment for possible behavioral variant frontotemporal dementia. *Alzheimer's & Dementia (New York, N. Y.)*, 8(1), e12299. <https://doi.org/10.1002/trc2.12299>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(51), 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5129-5134. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5129>
- Vu, K. B., Ghahroudi, M. A., Wyns, L., & Muyldermans, S. (1997). Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Molecular Immunology*, 34(16-17), 1121-1131. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(97\)00146-6](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(97)00146-6)
- Wang, C., Zhang, Y., Shao, S., Cui, S., Wan, Y., & Yi, M. (2019). Ventral Hippocampus Modulates Anxiety-Like Behavior in Male But Not Female C57BL/6 J Mice. *Neuroscience*, 418, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.032>
- Wang, J.-H., Gessler, D. J., Zhan, W., Gallagher, T. L., & Gao, G. (2024). Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1-33. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01780-w>
- Wang, W., Zhou, Q., Jiang, T., Li, S., Ye, J., Zheng, J., Wang, X., Liu, Y., Deng, M., Ke, D., Wang, Q., Wang, Y., & Wang, J.-Z. (2021). A novel small-molecule PROTAC selectively promotes tau clearance to improve cognitive functions in Alzheimer-like models. *Theranostics*, 11(11), 5279-5295. <https://doi.org/10.7150/thno.55680>
- Wang, X., Li, W., Marcus, J., Pearson, M., Song, L., Smith, K., Terracina, G., Lee, J., Hong, K.-L. K., Lu, S. X., Hyde, L., Chen, S.-C., Kinsley, D., Melchor, J. P., Rubins, D. J., Meng, X., Hostetler, E., Sur, C., Zhang, L., ... Smith, S. M. (2020). MK-8719, a Novel and Selective O-GlcNAcase Inhibitor That

- Reduces the Formation of Pathological Tau and Ameliorates Neurodegeneration in a Mouse Model of Tauopathy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 374(2), 252-263. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.266122>
- 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. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>
- Wegmann, S., Bennett, R. E., Amaral, A. S., & Hyman, B. T. (2017). Studying tau protein propagation and pathology in the mouse brain using adeno-associated viruses. *Methods in Cell Biology*, 141, 307-322. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.06.014>
- Wei, M.-L., & Andreadis, A. (1998). Splicing of a Regulated Exon Reveals Additional Complexity in the Axonal Microtubule-Associated Protein Tau. *Journal of Neurochemistry*, 70(4), 1346-1356. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70041346.x>
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858-1862.
- 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. *Journal of Cell Biology*, 118(3), 573-584. <https://doi.org/10.1083/jcb.118.3.573>
- Williams, D. R., Holton, J. L., Strand, C., Pittman, A., de Silva, R., Lees, A. J., & Revesz, T. (2007). Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain*, 130(6), 1566-1576. <https://doi.org/10.1093/brain/awm104>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12), 4506-4510. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.12.4506>
- Wolak, D. J., & Thorne, R. G. (2013). Diffusion of Macromolecules in the Brain : Implications for Drug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1492-1504. <https://doi.org/10.1021/mp300495e>
- Wood, J. G., Mirra, S. S., Pollock, N. J., & Binder, L. I. (1986). Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau (tau). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(11), 4040-4043.
- Wouters, Y., Jaspers, T., De Strooper, B., & Dewilde, M. (2020). Identification and in vivo characterization of a brain-penetrating nanobody. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00226-z>
- Wouters, Y., Jaspers, T., Rué, L., Serneels, L., De Strooper, B., & Dewilde, M. (2022). VHHs as tools for therapeutic protein delivery to the central nervous system. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00374-4>
- 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. *Current Gene Therapy*, 14(5), 343-351. <https://doi.org/10.2174/156652321405140926160602>
- Yamada, K., Cirrito, J. R., Stewart, F. R., Jiang, H., Finn, M. B., Holmes, B. B., Binder, L. I., Mandelkow, E.-M., Diamond, M. I., Lee, V. M.-Y., & Holtzman, D. M. (2011). In Vivo Microdialysis Reveals Age-Dependent Decrease of Brain Interstitial Fluid Tau Levels in P301S Human Tau Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 31(37), 13110-13117. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2569-11.2011>
- Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H., Cirrito, J. R., Patel, T. K., Hochgräfe, K., Mandelkow, E.-M., & Holtzman, D. M. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(3), 387. <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>
- Yamauchi, K., Koike, M., & Hioki, H. (2025). A three dimensional immunolabeling method with peroxidase-fused nanobodies and fluorochromized tyramide-glucose oxidase signal amplification. *Communications Biology*, 8(1), 903. <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08317-z>
- Yan, J., Li, G., Hu, Y., Ou, W., & Wan, Y. (2014). Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications. *Journal of Translational Medicine*, 12, 343. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0343-6>
- Yanamandra, K., Jiang, H., Mahan, T. E., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Diamond, M. I., & Holtzman, D. M. (2015). Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(3), 278-288. <https://doi.org/10.1002/acn3.176>
- Yanamandra, K., Kfoury, N., Jiang, H., Mahan, T. E., Ma, S., Maloney, S. E., Wozniak, D. F., Diamond, M. I., & Holtzman, D. M. (2013). Anti-Tau Antibodies that Block Tau Aggregate Seeding In Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition In Vivo. *Neuron*, 80(2), 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.046>
- Yang, J., Shen, N., Shen, J., Yang, Y., & Li, H.-L. (2023). Complicated Role of Post-translational Modification and Protease-Cleaved Fragments of Tau in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies. *Molecular Neurobiology*, 61(7), 4712. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03867-x>
- Yang, Z., & Wang, K. K. W. (2015). Glial fibrillary acidic protein : From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364-374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- Yao, D., Li, T., Yu, L., Hu, M., He, Y., Zhang, R., Wu, J., Li, S., Kuang, W., Yang, X., Liu, G., & Xie, Y. (2024). Selective degradation of hyperphosphorylated tau by proteolysis-targeting chimeras ameliorates cognitive function in Alzheimer's disease model mice. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1351792. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1351792>
- Ye, D., Chukwu, C., Yang, Y., Hu, Z., & Chen, H. (2024). Adeno-associated virus vector delivery to the brain : Technology advancements and clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 211, 115363. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2024.115363>
- Yogi, A., Hussack, G., van Faassen, H., Haqqani, A. S., Delaney, C. E., Brunette, E., Sandhu, J. K., Hewitt, M., Sulea, T., Kemmerich, K., & Stanimirovic, D. B. (2022). Brain Delivery of IGF1R5, a Single-

- Domain Antibody Targeting Insulin-like Growth Factor-1 Receptor. *Pharmaceutics*, 14(7), 1452. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071452>
- Yu, J., Song, Y., & Tian, W. (2020). How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00876-4>
- Zempel, H., Dennissen, F. J. A., Kumar, Y., Luedtke, J., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., & Mandelkow, E. (2017). Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(29), 12192-12207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784702>
- Zhang, F., Wei, H., Wang, X., Bai, Y., Wang, P., Wu, J., Jiang, X., Wang, Y., Cai, H., Xu, T., & Zhou, A. (2017). Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discovery*, 3, 17004. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2017.4>
- Zhang, W., Tarutani, A., Newell, K. L., Murzin, A. G., Matsubara, T., Falcon, B., Vidal, R., Garringer, H. J., Shi, Y., Ikeuchi, T., Murayama, S., Ghetti, B., Hasegawa, M., Goedert, M., & Scheres, S. H. W. (2020). Novel tau filament fold in corticobasal degeneration. *Nature*, 580(7802), 283-287. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2043-0>
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keeffe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A., & Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(36), 11929-11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>
- Zhang, Y., Cheng, S., Zhong, P., Wang, Z., Liu, R., & Ding, Y. (2022). Structural insights into the binding of nanobody Rh57 to active RhoA-GTP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 616, 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.05.084>
- Zhang, Y., Qian, L., Kuang, Y., Liu, J., Wang, D., Xie, W., Zhang, L., & Fu, L. (2022). An adeno-associated virus-mediated immunotherapy for Alzheimer's disease. *Molecular Immunology*, 144, 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.02.006>
- Zheng, J., Akbari, M., Schirmer, C., Reynaert, M.-L., Loyens, A., Lefebvre, B., Buée, L., Croteau, D. L., Galas, M.-C., & Bohr, V. A. (2020). Hippocampal tau oligomerization early in tau pathology coincides with a transient alteration of mitochondrial homeostasis and DNA repair in a mouse model of tauopathy. *Acta Neuropathologica Communications*, 8(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00896-8>
- Zheng-Fischhöfer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E.-M., Illenberger, S., Godemann, R., & Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3 β and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *European Journal of Biochemistry*, 252(3), 542-552. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2520542.x>
- Zhu, H., & Ding, Y. (2025). Nanobodies : From Discovery to AI-Driven Design. *Biology*, 14(5), 547. <https://doi.org/10.3390/biology14050547>
- Zimmermann, I., Egloff, P., Hutter, C. A., Arnold, F. M., Stohler, P., Bocquet, N., Hug, M. N., Huber, S., Siegrist, M., Hetemann, L., Gera, J., Gmür, S., Spies, P., Gyga, D., Geertsma, E. R., Dawson, R.

- J., & Seeger, M. A. (2018). Synthetic single domain antibodies for the conformational trapping of membrane proteins. *eLife*, 7, e34317. <https://doi.org/10.7554/eLife.34317>
- Zupancic, J. M., Smith, M. D., Trzeciakiewicz, H., Skinner, M. E., Ferris, S. P., Makowski, E. K., Lucas, M. J., McArthur, N., Kane, R. S., Paulson, H. L., & Tessier, P. M. (2023). Quantitative flow cytometric selection of tau conformational nanobodies specific for pathological aggregates. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1164080>

ANNEXES

RESEARCH

Open Access



Anti-tau VHH therapy against PHF6: a safe approach to slowing the phenotype of tau pathology

Raphaëlle Caillierez^{1*} , Clémence Leboullenger², Sarah Leclercq¹, Mélanie Besegher², Séverine Bégard¹, Florent Auger², Claude-Alain Maurage³, Bertrand Accart³, Justine Morteletcque^{4,5}, Elian Dupré^{4,5}, Clément Danis^{1,4,5}, Isabelle Landrieu^{4,5†}, Luc Buée^{1*†} and Morvane Colin^{1*†}

Abstract

Background Tauopathies share common features, including tau aggregation, which plays a central role in neurodegeneration. However, these disorders are highly heterogeneous, particularly in the spread of pathological tau species between cells. In Alzheimer's disease, intracellular tau aggregation is followed by a propagation between cells leading to a hierarchical pathway of neurodegeneration, whereas in other tauopathies, such as progressive supranuclear palsy (PSP), pathological tau remains largely confined within neurons and exhibits more limited spread. This variability raises the question of whether tailored treatments for each tauopathy might offer more therapeutic benefit. Hence, we designed two different immunological approaches using single domain antibody fragments, also called VHHs, to target intracellular and extracellular tau. This study aims to first evaluate the safety of these immunological tools on physiological tau and then their potential to slow disease progression.

Methods We selected the pro-aggregative tau hexapeptide PHF6 as a common target for the VHHs. These VHHs were cloned in viral vectors allowing to compare two different expression systems: 1) intracytosolic expression to prevent tau accumulation (intraVHH) and 2) secretion into the interstitial fluid, to prevent tau spreading (extraVHH). By stereotactic injection of viral vectors, these VHHs were expressed in the brain of transgenic or wild-type mice and three readouts were studied: behavior, brain imaging and tau lesions.

Results We validated the correct addressing of intra- and extraVHHs. These two constructs were not associated with adverse effects, even in the absence of tau overexpression, in wild-type mice. Their efficacy was demonstrated in transgenic mouse tau models, either chronic long-term or in acute seeding with injections of human brain homogenates from Alzheimer's disease patients. They both can slow down several pathological effects (i.e. cognitive deficits, cerebral atrophy and neuronal hyperphosphorylation of tau).

[†]Isabelle Landrieu, Luc Buée and Morvane Colin equal contributors.

*Correspondence:

Raphaëlle Caillierez
raphaëlle.caillierez@inserm.fr
Luc Buée
luc.buee@inserm.fr
Morvane Colin
morvane.colin@inserm.fr

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Conclusions This study is a proof of concept demonstrating that VHHs can be engineered to reduce both intra- and extracellular tau pathologies without major adverse effects, making them of interest for therapeutic applications.

Keywords Tauopathies, VHH, Single domain antibodies, PHF6, Tau spreading, Immunotherapy, Alzheimer's disease, PSP

Background

Tauopathies are a heterogeneous group of neurodegenerative diseases that share a common feature: the intracellular accumulation of tau protein [1]. During the pathological time course, this microtubule-associated protein assembles into fibrillar structures, leading to neurofibrillary degeneration (NFD) in Alzheimer's disease (AD), which is correlated with cognitive decline [2, 3]. These intraneuronal lesions are composed of paired helical and straight tau filaments. Their composition, defined by cryoEM studies, revealed an ordered core of paired protofilaments comprising residues 306–378, and disordered amino- and carboxy-termini forming the fuzzy coat [4]. Additionally, tau oligomers are now considered to be the toxic tau species in several neurodegenerative disorders such as AD [5]. These intraTau species, in their fibrillar and/or oligomeric structures, are now considered to be very important targets in AD. The appearance of tau lesions in AD follows a hierarchical progression in a pattern that is similar among patients. This stereotypical progression is known in the literature as the Braak stages [6, 7], which are now considered to be steps in the 'prion-like' propagation of neurodegeneration, thus identifying pathological extraTau as a potential target [8].

Anti-tau therapies, particularly immunotherapies, have since been developed [8, 9], and peripheral injection of monoclonal antibodies is already used in clinical trials [9, 10]. Unfortunately, they poorly penetrate the brain, with only 0.1% to 0.2% crossing the blood–brain barrier [11], and therefore have great difficulty reaching their target in the interstitial fluid that surrounds cells. In this context, antibody engineering represents an alternative approach to target the tau protein. Several studies in mouse models of tau pathology have demonstrated the potential of anti-tau antibody fragments (variable fragment of single chain antibodies or scFv) to reduce pathology [12–15]. In addition, the development of other single-domain antibody fragments, such as the variable domain of the heavy chain of heavy chain-only antibodies (VHHs), is also promising. Since their discovery in 1993 [16], VHHs, which correspond to the variable fragment of antibodies without a light chain, have proved to be powerful not only in research applications but also in medicine and have attracted intense preclinical and clinical interest over the past two decades [17]. Their entry into the neurodegenerative field began in the 2010s and they are now

widely studied in the hope of addressing the challenges of antibody-based therapy targeting the central nervous system. Their high solubility facilitates intracellular protein targeting, they are easy to produce in bacteria, induce less immunogenicity than classical immunoglobulin G (IgG) antibodies, and exhibit good antigen binding capabilities and strong tissue penetration [18]. Additionally, their small size (12 to 15 kDa) and the structure of their antigen-binding loops facilitate access to some epitopes that are difficult to reach with conventional antibodies [19]. Some anti-tau VHHs have demonstrated the ability to target intraTau [20–26] and, when modified for secretion, to target extraTau [27]. They are then invaluable, readily adaptable tools in the fight against tauopathies where specific toxic species are known in the brain parenchyma [28] as well as in biological fluids [29, 30].

Previously, we developed an anti-tau VHH called Z70 that targets tau, specifically the PHF6 epitope [22]. This PHF6 hexapeptide (₃₀₆VQIVYK₃₁₁) is located in the third microtubule binding domain (MTBD) of tau and plays a central role in its aggregation [31–33]. Indeed, early filamentous assemblies of tau have been shown to be predominantly composed of the PHF6 peptide arranged in cross- β sheet structures [33]. We have previously shown that neutralizing intraTau species reduces tau nucleation in vitro, but also in an acute mouse model of tau seeding [22]. Although a proof of concept of great interest, several limitations of this study remain, as the seeding model and lentiviral delivery used in this experiment limit the assessment of larger (whole brain) and longer (ageing of tauopathy mouse models) effects of treatment. In addition, studying extended spatial and temporal effects raise the related question of safety under these conditions of increased exposure. Indeed, the PHF6 is not a specific epitope for pathological tau and it remains to be shown that the VHHs do not affect brain function.

In this study, three main sections are highlighted: development of the tools, their safety and their efficacy. First, the safety of AAV viral vectors expressing anti-PHF6 VHH intracellularly or extracellularly was extensively evaluated using several complementary assays. We then tested the efficacy of targeting extraTau or intraTau and reducing different aspects of tau pathology on a mouse time scale that may be related to ageing. We demonstrated the efficacy of VHHs in preventing cognitive deficits or cerebral atrophy and reducing neuronal

tau hyperphosphorylation, while the overall safety of the approach was strongly supported by multiple indicators. The comparison of the intraTau and extraTau VHH approaches allowed a better mechanistic understanding of their activities, which is of general interest for the development of anti-tau bio-therapies.

Material and methods

VHH and adeno-associated vectors (AAVs)

As previously performed in our laboratories, VHHs were selected from the screen of a synthetic phage-display library of humanized llama single-domain antibody [22, 34]. Here, VHHs were produced using plasmids encoding a C-terminal mCherry protein fused with Z70 to target intraTau (intraZ70) or fused with a VHH against GFP as a control (intraCtrl). To target extraTau, plasmids encoding an N-terminal interleukin-2 secretion sequence and a C-terminal mouse mIgG-Fc2 [34] was fused to Z70 to target extraTau (extraZ70) or fused with a VHH against GFP as a control (extraCtrl) were used (Fig. 1A). AAVs vectors driven by a cytomegalovirus promoter were purchased from VectorBuilder. AAV serotypes and cerebral injection sites were tested for maximal brain coverage [35]. To insure the greatest dispersion of our vector, we evaluated four AAV serotypes already described for their central nervous system tropism [36] (AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9 and AAV2/10; encoding GFP protein, Fig. S1A). Intra-cerebroventricular delivery is not efficient regardless of the serotype used (Fig. S1B). Contrary, GFP is expressed after intra-hippocampal injections with AAV2/8 significantly less efficient than AAV2/7, AAV2/9 and AAV2/10 (Fig. S1C). To discriminate these three candidates, and because the tau transgenic mice used in this study (THY-Tau30 named Tg30) present tau pathology in the spinal cord [37], immunostaining of GFP in this area was also performed. AAV2/9 allowed the best GFP expression in the spinal cord in wild-type mice (Fig. S1D) and is expressed in the dorsal, cervical and thoracic part of the spinal cord (Fig. S1E, left part) where tau pathology is present (Fig. S1E, right part) and was therefore selected for the further study.

Cell culture and cell transfection

HEK293T cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 1% GlutaMAX, and without HEPES. The cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO₂. All cell lines were passaged twice a week. Cells were seeded in 24-well plates (0.8.10⁶ cells per well); 24 h later, cells were transfected with 500 ng of plasmids encoding intraZ70, intraCtrl, extraZ70 or extraCtrl together with lipofectamine in opti-MEM, as recommended by the manufacturer (Invitrogen). 48 h later, supernatants were collected and cells lysed in RIPA 1X buffer (150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% NP-40, EDTA free protease inhibitor, 50 mM Tris base at pH 8), homogenate was sonicated and samples were stored at −80 °C.

Biochemical analyses

Protein concentrations were evaluated using a BCA assay (Pierce), subsequently diluted with lithium dodecyl sulfate 2X supplemented with reducing agents (Invitrogen) and then separated on 4–12% NuPAGE Bis-Tris Gels (Invitrogen). Proteins were transferred to nitrocellulose membrane, then saturated in TNT (Tris 15 mM pH8, NaCl 140 mM, 0.05% Tween) with 5% non-fat dry milk or 5% BSA and incubated with primary antibodies (see Table 1) overnight at 4 °C and with the corresponding secondary antibodies: peroxidase labeled horse anti-rabbit and anti-mouse (1/5,000 and 1/50,000 respectively, Vector Laboratories). Signals were revealed using a chemiluminescence assay (ECL, Amersham Bioscience) and visualized using a LAS4000 imaging system (GE Healthcare). Results were quantified using ImageQuant software to allow normalization. For synaptosome preparation, a mouse hippocampus was homogenized in Tris buffer (pH 7.4) containing 10% sucrose using a Potter–Elvehjem on ice. Syn-PERTM Synaptic Protein Extraction Reagent (#87,793; Thermofisher, France) was then added to 100 µL of brain homogenate. The samples were homogenized again using a Potter–Elvehjem and then centrifuged (1200 g; 10 min at 4 °C). Cell debris were discarded, supernatants centrifuged (15,000 g; 20 min at 4

(See figure on next page.)

Fig. 1 VHH constructs- (A, B) AAV2/9 constructs encoding under the expression control of a CMV promoter. **A** intraZ70 or intraCtrl—VHHs fused to a mCherry tag protein or **B** extraZ70 or extraCtrl—VHHs fused to an IL2 secretion signal and a Fc portion of mouse IgG2 **C** HEK293T cells were transfected with intraCtrl, intraZ70, extraCtrl and extraZ70 plasmids and VHH expression was detected by Western blot in cell lysate (C) or media (M) using anti-bodies against VHHs (upper panel) or antibodies against Fc (lower panel). The black star indicates the presence of cell culture medium contaminants, which are also present in non-transfected cells (NT). The black arrows point to the VHHs. **D** AAVs encoding VHHs were injected into the hippocampus of Tg30, and the viral DNA episome from the hippocampus were detected by qPCR, 1 or 9 months after injection. **E** Immuno-fluorescence detection of extraVHH (anti-VHH) and the endoplasmic reticulum (anti-calreticulin) was done using hippocampal sagittal sections of mice, 9 months post-injection. ExtraVHH is visualized in green and the ER in purple. Fluorochrome overlays are analyzed in cells and illustrated on the right part of the figure

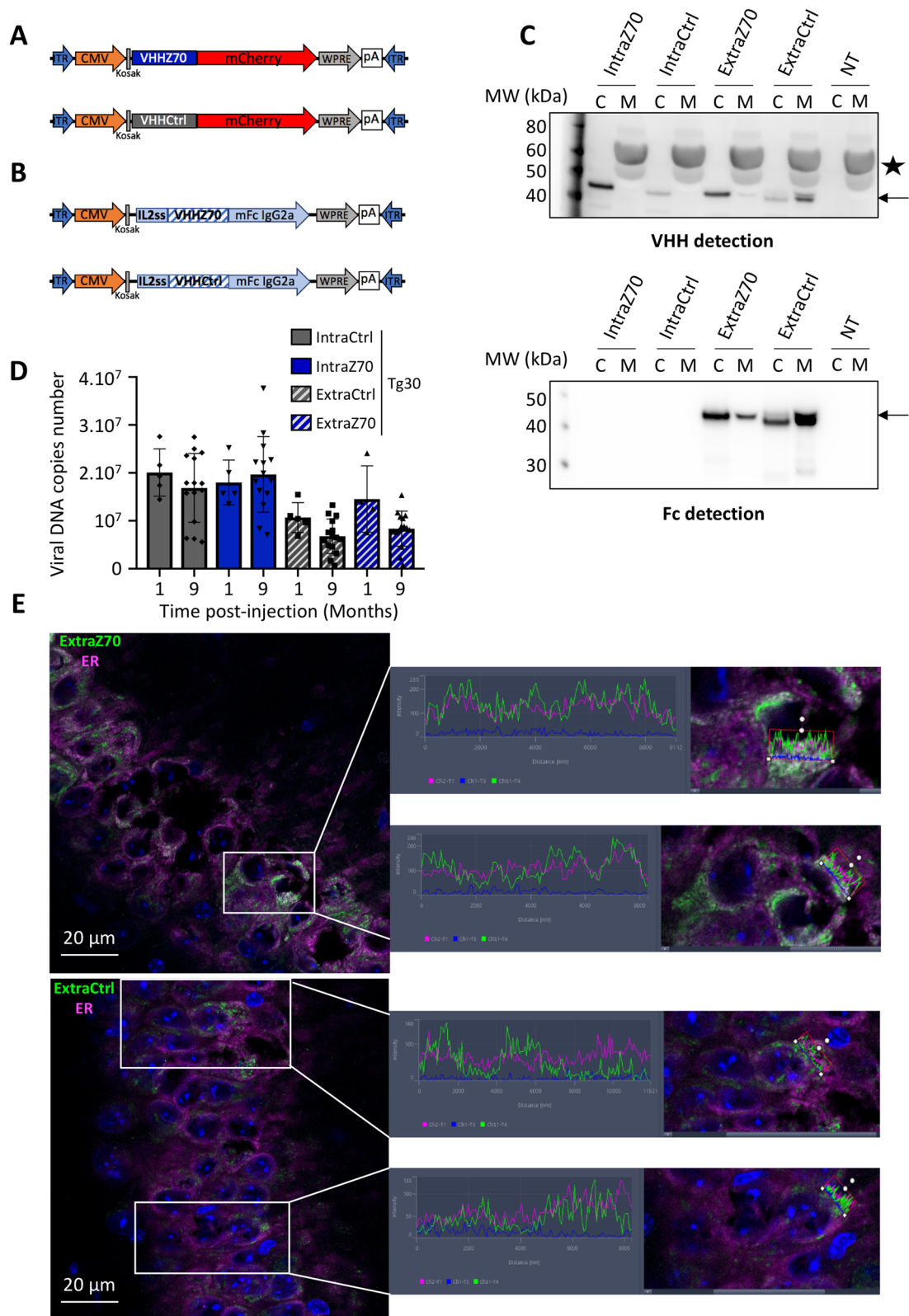


Fig. 1 (See legend on previous page.)

Table 1 List of primary and secondary antibodies used for western blot, immunohistochemistry or immunohistochemistry

Antibody	Application	Manufacturer's reference	Dilution	Host species
<i>Primary antibodies</i>				
Tau C-ter	WB	Home-made, 993-S1	1/4,000	Rabbit
NeuN	WB	Abcam, ab177487	1/5,000	Rabbit
GFAP	WB	Sigma-Aldrich, G3893	1/1,000	Mouse
Iba1	WB	Abcam, ab178846	1/1,000	Rabbit
pEIF2 α	WB	ThermoFischer, MA5-15133	1/1,000	Rabbit
EIF2 α	WB	Cell Signaling, 5324	1/1,000	Rabbit
ATF4	WB	Cell Signaling, 11815	1/1,000	Rabbit
pErk	WB	Cell Signaling, 9106	1/2,000	Mouse
Erk	WB	Cell Signaling, 9102	1/1,000	Rabbit
Snap25	WB	SantaCruz, sc-376713	1/1,000	Mouse
PSD95	WB	Cell Signaling, 2507	1/1,000	Rabbit
LC3b	WB	Cell Signaling, 2775	1/2,000	Rabbit
MBP	WB	Sigma Aldrich AB15542	1/5,000	Rabbit
CPNPase	WB	Abcam, ab6319	1/1,000	Mouse
GAPDH	WB	Sigma Aldrich, G9545	1/50,000	Rabbit
Actin	WB	Sigma Aldrich, A5441	1/25,000	Mouse
AT8biot	IHC/IF	Invitrogen, MN1020B	1/500	-
AT100	IHC	Invitrogen MN1060	1/500	Mouse
MC1	IHC	Peter Davies lab	1/500	Mouse
Iba1	IHC	Wako, 019-19741	1/1000	Rabbit
AT8	IF	Invitrogen, MN1020	1/500	Mouse
VHH	IF	Eurogentec EG-VHH001	1/1,000	Rabbit
RFP	IF	Rockland, 600-401-379	1/1,000	Rabbit
Calreticulin	IF	Thermo, PA3-900	1/500	Rabbit
GFP	IF	Synaptic System 132002	1/1,000	Rabbit
<i>Secondary antibodies</i>				
Anti-mouse IgG Fc cross-adsorbed HRP	WB	Invitrogen 31439	1/20,000	Goat
Anti-rabbit IgG (H + L) peroxidase	WB	Vector Laboratories, PI-1000	1/5,000	Goat
Anti-mouse IgG (H + L) peroxidase	WB	Vector Laboratories, PI-2000	1/50,000	Horse
Anti-mouse IgG (H + L) biotinylated	IHC	Vector Laboratories, BA-2001	1/400	Goat
Anti-rabbit IgG (H + L) biotinylated	IHC	Vector Laboratories, BA-1000	1/400	Goat
Anti-mouse IgG, Fcy fragment specific Alexa Fluor 488	IF	Jackson ImmunoResearch, 115-545-008	1/500	Goat
Anti-mouse IgG (H + L), Alexa fluor 488	IF	Invitrogen, A11001	1/1,000	Goat
Anti-rabbit IgG (H + L), Alexa fluor 647	IF	Invitrogen, A21245	1/1,000	Goat
Streptavidine, conjugued Alexa Fluor 647	IF	Invitrogen S21374	1/500	-
Streptavidine conjugued Alexa Fluor 568	IF	Invitrogen S11226	1/500	-

°C) and the resulting pellets suspended in 100 μ L of Syn-
PER™ solution. For induction of ATF4 and EIF2 α , SH-
SY5Y cells were incubated with 20 μ M of sodium arsenic
for 6 h at 37 °C.

Animals

The study was performed in accordance with French and
European Community rules. The experimental research
was performed with the approval of an ethics commit-
tee (agreement APAFIS #43474-2023050714441306 v6)

and follows European guidelines for the use of animals.
The animals (males and females) were housed in a tem-
perature controlled (20–22°C) room maintained on a
12 h (h) day/night cycle with food (SAFE R04-25) and
water provided ad libitum in a specific pathogen-free
animal facility ($n=5$ mice per cage). Animals were allo-
cated to experimental groups by randomization. THY-
tau30 transgenic mice (Tg30) express human 1N4R
tau protein with two pathogenic mutations (P301S and
G272V) under the control of the neuron-specific Thy1.2

Table 2 Animal groups

Injection site & AAV selection		Injection-ICV	Injection-HIPP	IHF				
WT & Tg30	AAV2/7	3 ♀	3 ♀	6				
	AAV2/8	3 ♂	3 ♂	6				
	AAV2/9	3 ♀	3 ♀	6				
	AAV2/10	3 ♂	3 ♂	6				
		Injection	Behavior	Imaging	qPCR	IHC	IHF	WB
	Tg30 intraCtrl	15 (9♂ + 6♀)	15	15	15	15	15	-
	Tg30 intraZ70	15 (10♂ + 5♀)	15	14	14	14	14	-
	Tg30 extraCtrl	15 (6♂ + 9♀)	15	15	15	15	15	-
VHH episome	Tg30 extraZ70	15 (6♂ + 9♀)	15	15	15	15	15	-
	WT AAV2/9	15 (5♂ + 10♀)	15	15	15	15	15	15
	WT GFP	15 (6♂ + 9♀)	15	15	15	15	15	15
	WT intraZ70	15 (6♂ + 9♀)	15	14	14	14	14	14
	WT extraZ70	14 (8♂ + 6♀)	14	13	12	12	12	12
		Injection	qPCR	IHF				
	Tg30 intraCtrl	5 (3♂ + 2♀)	5	5				
	Tg30 intraZ70	5 (3♂ + 2♀)	5	5				
	Tg30 extraCtrl	5 (2♂ + 3♀)	5	5				
	Tg30 extraZ70	5 (3♂ + 2♀)	4	4				

The number and sex of mice injected and among them the number of animal used for separate experiment are shown

Difference between a few groups and pathological assessment is due to premature death of animals

ICV intracerebroventricular, HIPP hippocampus, IHF immunofluorescence, IHC immunohistochemistry, WB western-blot, qPCR quantitative polymerase chain reaction

promoter [37, 38]. Animals used in this study are detailed in Table 2. Whereas considering Sex As a Biological Variable (SABV) is of interest, this study grouped male and female mice together for ethical reasons, primarily to minimize the number of animals sacrificed. This approach also ensured statistical power, particularly for our imaging and behavioral assays.

AD brain homogenate (hAD) preparation

Two human AD brain samples (Braak 6, frontal cortex) were obtained from the Lille Neurobank (fulfilling criteria of the French law on biological resources and declared to competent authority under the number DC-2008-642) with donor consent, data protection and ethical committee review. Samples were managed by the CRB/CIC1403 Biobank, BB0033-00030. Extract was homogenized on ice with a glass potter in five volumes (w/v) of phosphate-buffered saline (PBS) and then sonicated (50 runs, amplitude 60, VibraCell 72405, Bioblock Scientific). Protein concentration was determined using a BCA assay. Sonicated h-AD was centrifuged at 4 °C 3,000 g for 5 min and then the supernatant was aliquoted and kept at -80 °C until use.

Stereotaxic injection

One month-old anesthetized Tg30 or littermate mice were submitted to stereotaxic intracranial injections of AAV at 1.5×10^{13} genome copies/mL in 2 µL at 250 nL/minutes (min) with a Hamilton glass syringe. For AAV serotype selection, bilateral stereotaxic injections were performed in the hippocampus of Tg30 mice (coordinates from bregma antero-posterior (AP): -2.5; medio-lateral (ML): ± 1 ; dorso-ventral (DV): -1.8) or in cerebral ventricle (coordinates from bregma AP: -0.4; ML: ± 1 ; DV: -2.2) with AAV serotype 2/7, 2/8, 2/9 or 2/rh10 expressing GFP protein under a CMV promoter (VectorBuilder). For VHH efficiency assays, Tg30 mice were bilaterally injected at the same hippocampal coordinates with AAV2/9 expressing either intraZ70, intraCtrl, extraZ70 or extraCtrl (Fig. 1A and B). Littermate mice were injected at the same hippocampal coordinates with either control AAV (AAV2/9) or with AAVs expressing GFP protein, or with intra or extraZ70. For the seeding mouse model, one month-old Tg30 animals were injected at the same coordinates (AP: -2.5, ML: ± 1 ; DV: -1.8) with lentiviral vectors expressing intraCtrl, intraZ70, extraCtrl, extraZ70 as previously done [22]. Two weeks later, 2 µL (5 µg/µL) of human h-AD were inoculated at the same injection site.

Behavioral tests

The behavioral tests were done during the rodent light cycle.

Y-maze

Seven months after stereotaxic injections, mice were tested for short-term hippocampus-dependent spatial working memory using a two-trial Y-maze task [39]. The arms of the maze were 22 cm long, 6.4 cm wide and 15 cm deep. The floor of the maze was covered with sawdust that was mixed after each trial in order to eliminate olfactory cues. Various extra-maze visual clues were placed on the surrounding walls. Experiments were conducted with an ambient light level of 7 lx. During the exposure phase, mice were assigned to two arms (the “start arm” and the “other arm”), which can be freely explored during 5 min, without access to the third arm of the maze (the “novel arm”), blocked by an opaque door. The assignment of arms was counterbalanced within each experimental group. Mice were then removed from the maze and returned to their home cage for 2 min. During the test phase, mice were placed at the end of the same “start arm” and allowed to freely explore all three arms during 5 min. The amount of time spent in each of the arms in the first minute was recorded using EthovisionXT (Noldus, Netherlands). A discrimination index is applied on the test phase, corresponding to the time in the novel arm $\times 100 / (\text{time in novel arm} + \text{time in other arm})$. The distance travelled and the velocity were determined on the 5 min of exploration.

OpenField

Seven months after injections, exploratory activity and anxiety-like behavior without predator stimuli was assessed in an openField arena (49 $\times$ 49 cm) under medium-light intensity (60 lx) [40]. Plastic walls were always cleaned with 30% ethanol between each trial. Mice were placed in the center and were allowed to explore the arena for 10 min. The distance travelled and the velocity were considered as the main parameters of locomotion. The inner zone was considered as center and time spent in the center was compared to the time near the walls. The amount of time spent in each zone was recorded using EthovisionXT (Noldus, Netherlands).

Magnetic resonance imaging (MRI)

Acquisition

The images are taken on a 7 T MRI (Bruker, Biospec, Etlingen, Germany). A cylindrical transmitting coil 86 mm diameter coupled to a surface receiving coil dedicated to the mouse brain allows data recording. The animals are anesthetized during the acquisitions with isoflurane (1.5%) and their temperature is kept constant

thanks to a hot water circuit integrated into the bed on which the animal is positioned. A pressure sensor is placed under the abdomen to monitor breathing during the various acquisitions, and a pulse oximetry sensor is placed on its leg. The procedure lasts approximately 1 h 25 min per animal and includes a total of 6 sequences acquired successively. The imaging protocol begins with a gradient echo sequence which allows control of the positioning of the brain at the center of the magnetic field of the MRI, 15 images are then acquired (5 images for each of the three reference planes, axial, coronal and sagittal). A second 2D identification sequence is carried out, in spin echo of 10 contiguous coronal sections of 0.7 mm thickness, T2 weighted, making it possible to control the transverse orientation of the brain. The sequence parameters are as follows: A time repetition (TR) of 2500 milliseconds (ms), an echo time (TE) of 33 ms, the field of view (FOV) is a 2-cm square, coded by a matrix of 256 by 256, i.e. a resolution of 78 microns per pixel. A 2D diffusion tensor imaging (DTI) sequence of 30 0.5 mm axial sections is applied using the echo planar imaging (EPI) acquisition method in order to measure the mobility parameters of water molecules, such as the Fractional Anisotropy (FA) and the Mean Diffusivity (MD). The sequence parameters are as follows: A TR of 2500 ms, an echo time (ET) of 30 ms, the FOV is a rectangle of 2.2 $\times$ 1.5 cm, coded by a matrix of 220 by 150, i.e. a pixel of 100 microns of side. This sequence is coded in 30 directions with a b-value of 850 s/mm². Homogenization of the magnetic field is obtained by the MAP-SHIM method by placing a narrowed voxel around the brain. In addition, a reverse-phase image acquired for DTI sequence is duplicated by adjusting its inverted phase coding direction parameters, without gradient diffusion, in order to correct in a post-processing analyze the distortions due to the EPI method. Then an anatomical T2 weighting sequence geometrically recalled to the DTI is carried out with the following parameters: A TR of 5000 ms, an ET of 33 ms, with a geometry identical to the DTI sequence. Finally, a 3D anatomical sequence of the brain is acquired in order to carry out volumetric calculations of brain structures. It is T2 weighted with a TR of 1800 ms, an ET of 36 ms, the FOV is a voxel of 20 $\times$ 15.5 $\times$ 12 cm, coded by a matrix of 154 by 119 by 92, i.e. an isotropic resolution of 130 microns per pixel.

Data processing

First, bias field inhomogeneity is corrected from T2-weighted images using N4 algorithm [41]. Then images were denoised with a multiresolution non-local means filter [42]. Brain mask and label segmentation were extracted in using multi-atlas label fusion [43] and from the National University of Singapore (NUS) mouse

atlas [44]. 39 bilateral Regions of Interest (ROIs) were extracted and their volume was calculated (Whole Brain, CA1, Dentate Gyrus, Hippocampus, Amygdala, Caudoputamen, Corpus callosum, Lateral ventricle, Motor cortex, Perirhinal cortex, Visual cortex, Thalamus). On 3D T2 weighted images, a voxel-wise p -values method was performed to compare volumes of the cerebral regions of WT-AAV2/9 mice to the three other groups in using an approximate two-sample Fisher-Pitman permutation test with resample = 10,000 [45]. For p -value < 0.05, a $-\log_{10}(p\text{-value})$ was applied. Label values were modified with those p -values were then applied on their atlas ROIs and overlapped to the MRI template.

DTI images statical analysis

First, DTI images were corrected for motion using AFNI (<https://afni.nimh.nih.gov/>) function. Then, TOPUP function was applied to the pair of phase image. DTI data were denoise with Mrtrix package (<https://www.mrtrix.org/>) and bias field inhomogeneity is corrected from T2-weighted images using N4 algorithm. T2 weighted image and mask and label images were rigidely co-registered over the B0 image with functional source license FSL. (<https://fsl.fmrib.ox.ac.uk>). Eddy correction were applied on diffusion image using FSL. *Different* diffusion tensor parametric maps were generated with FSL, including FA, MD, Longitudinal (LD) and Radial (RD) diffusivities. Data from all the animals were averaged/ROI and presented as mean standard deviation (SD).

[18 F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (PET) acquisitions

Glucose cerebral metabolism was studied by performing a PET-computed tomography (CT) scan (Inveon, Siemens, Knoxville, TN, USA) with an intraperitoneal injection of 18-fluorinated glucose analogue ([18 F] fluorodeoxyglucose, (0.5 MBq / g; 0.3 ml in volume, Curium, Glisy, France). A 15-min PET scan was initiated 45 min after radiotracer injection. All CT scans were registered to an in-house CT template and brain masks were extracted and applied to PET images with ANTS (Advanced Normalization package <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/> Normalization Tools package). PET images were then registered to NUS mouse atlas [44]. ^{18}F DG brain uptake values were expressed as Standardized Uptake Values (SUV). SUV were then extracted in brain areas using NUS atlas. Elected regions SUV values were normalized with cerebellum SUV values.

Tissue processing

For AAVs serotype selection and the seeding model, 1 month after stereotaxic injection, Tg30 were deeply anesthetized with 100 mg/kg Ketamine and 10 mg/kg

Xylazine, trans-cardially perfused with ice-cold 0.9% saline solution then 10 min with fresh 4% paraformaldehyde (PFA). The brains and spinal cords were immediately removed and post-fixed in 4% PFA over-night (ON). Brain was washed in phosphate-buffered saline (PBS), placed in 20% sucrose ON, and frozen 1 min in isopentane. Free-floating sagittal (AAVs selection) or coronal (seeding model) sections (40- μm thickness) were obtained using a cryostat microtome. Spinal cord was incubated in 70% ETOH overnight, 80% ETOH 90 min, 95% ETOH 90 min, 100% ETOH 90 min, 100% Xylene 2 times 2 h each, paraffin 55 °C 2 times 90 min each and embedded. 7 μm sections were performed with Leica microtome. For VHH efficiency assays, 9 months after stereotaxic injection, WT or Tg30 were deeply anesthetized with 100 mg/kg Ketamine and 10 mg/kg Xylazine and trans-cardially perfused with ice-cold 0.9% saline solution. The brains were immediately removed and a brain hemisphere was post-fixed in 4% PFA for 7 days, washed in PBS, placed in 20% sucrose ON, and frozen 1 min in isopentane. Free-floating sagittal sections (40- μm thickness) were obtained using a Leica cryostat. The second hemisphere was extracted, the hippocampus separated and frozen for biochemical analysis.

DNA extraction from hippocampus and qPCR protocol

One- and 9 months post-injection, hippocampi were lysed by sonication in 200 μL in a tris base 10 mM pH 7.4 – sucrose 10% solution. The DNA was extracted using 15 μL of lysate in the Nucleospin Tissue XS, Micro kit (740,901.50, Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR analysis was performed on Applied Biosystems™ QuantStudio3™ Real-Time PCR Systems, using 2 μL at 25 ng/ μL of the previously obtained products, 1 μM oligonucleotides specific to VHH (reverse ATA CGT AGC TGT GTC CTC GG and forward GAG TTC GTT TCC GCC ATC TC), in a commercial SYBRGreen Master Mix (GoTaq Green Master Mix 2X, Promega). The thermal cycler conditions were as follows: 95 °C for 10 min, then 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Viral copies genome number were deducted from standard curve generated after QPCR of plasmid encoding VHH with the same experimental conditions.

Immunohistofluorescence

For extraVHH, brain sections were saturated in normal goat serum (1/100; S-1000, Vector), then incubated with the primary antibody anti-Fc conjugated with Alexa 488 (AffiniPure Goat Anti-mouse IgG, Fcy fragment specific; 1/500; 115–545-008, Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature in PBS-0.2% Triton X-100. Then they were incubated with the antibody anti-tau AT8

biotinylated (1/500; MN1020B, Invitrogen) ON at 4 °C in PBS-0.2% Triton X-100. Biotin of anti-AT8 were revealed using either Alexa 568-Streptavidin (1/500; S11226, Invitrogen) for mice sacrificed 9 months post-injection or with Alexa 647-Streptavidin (1/500; S21374, Invitrogen) for mice sacrificed 1 month post-injection. For intraVHH, brain sections were saturated in normal goat serum (1/100; S-1000, Vector laboratories), then incubated with the primary antibodies anti-tau AT8 (1/500; mouse; MN1020, Invitrogen) and anti-RFP (1/1,000; rabbit; 600–401-379, Rockland) ON at 4 °C in PBS-0.2% Triton X-100. Labeling was detected using a goat anti-mouse secondary antibody conjugated with Alexa 488 (1/1,000; A11001, Invitrogen) and goat anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 647 (1/1,000; A21244 or A21245, Invitrogen).

For both extra- and intraVHH, slices were coverslipped with mounting medium supplemented with DAPI (H1200, Vector laboratories) to reveal nuclei. Acquisitions were performed using either a slide scanner (Axioscan Z1-Zeiss) with a 20X objective or an inverted confocal microscope (LSM 710, Zeiss, Jena, Germany) with a 20X or 63X oil-immersion lens. Mean intensity projection (merged of individual focal plans) or individual focal plan are shown. Profile superpositions are done using the ZEB blue software (3.6 blue edition). Colocalization studies were carried out on individual focal planes $\leq$ 1 μ m to demonstrate the proximity of the markers analyzed. The superposition of the two fluorochromes was detected using the 'profile' tools of the ZEN blue software (3.6blue edition).

For AAV serotype selection, spinal cord sections were deparaffinized and unmasked via citrate buffer (3.75 mM Acid citrate, 2.5 mM disodium phosphate, pH 6) for 10 min in a domestic microwave. Spinal cords and brain sections were saturated in normal goat serum (1/100; Vector), then incubated with the primary polyclonal antibodies anti-GFP (1/1,000, rabbit, Synaptic System) ON at 4 °C in PBS-0.2% Triton X-100. Labeling was detected using a secondary anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 568 (1/500; Invitrogen). Slices were coverslipped with mounted medium added with DAPI (Vector) to reveal nuclei. Section imaging was performed using a slide scanner (Axioscan Z1-Zeiss) with a $\times$ 20 objective. Quantification of the GFP staining and DAPI was performed using ImageJ.

Immunohistochemistry and quantification

Free-floating sagittal sections were used for immunohistochemistry. Nonspecific binding was blocked by using "Mouse in Mouse" reagent or normal goat serum (1/100; Vector Laboratories). Brain slices were next incubated with the biotinylated primary monoclonal

antibody AT8 (1/500; Thermo MN1020b), AT100 (1/500; Thermo MN1060), MC1 (1/500; Peter Davies's gift) or Iba1 (1/1000; Wako 019–19741) in PBS- 0.2% Triton X-100, ON at 4 °C. For AT100 and MC1 staining, slices were incubated with biotinylated anti-mouse secondary antibody (1/400; Vector BA2001); for Iba1 slices were incubated with biotinylated anti-rabbit secondary antibody (1/400; Vector BA1000). The avidin/biotin-HRP complex (ABC kit, 1:400 in PBS, Vector) was used to amplify signals prior to addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Vector) in Tris-HCl 0.1 mol/L, pH 7.6, containing H₂O₂. Brain sections were mounted, air-dried, steadily dehydrated in ethanol (30%, 70%, 95%, 100%), cleared in toluene, and coverslipped with Vecta-Mount (Vector Laboratories). For blinded quantification, sagittal brain sections (10 to 17 slices per mouse) from ML bregma 0.3 to 3.5 (based on the Mouse Atlas, George Paxinos and Keith B.J. Franklin, Second Edition, Academic Press) (Fig. S2A) were analyzed using histology software (Mercator image analysis system; Explora Nova). Threshold was established manually to present a minimal background and remained constant throughout the analysis (Fig. S2B).

Plasma analysis

At sacrifice, blood samples were collected by cardiac puncture using Microvette CB 300 EDTA K2E (Sarstedt) and centrifuged at 2000 g for 10 min at 4 °C. Plasma were then stored at –80 °C. Simoa Neuro 4-Plex B (Quanterix) was used to quantify NF-light, tau, GFAP and UCH-L1. Mouse plasma was re-spun 5 min at 10 000 g at 4 °C, diluted 8 times in the assay buffer and the experiment were next performed in duplicate using manufacturer's instructions. Samples were analyzed on the Simoa SR-X analyser (Quanterix). Manufacturer's controls were in the specified range and samples were above LLOQ for each measurement (Analytical LLOQ=0.5 pg/mL for Tau, 2 pg/mL for NfL, 9.38 pg/mL for GFAP and 37.5 pg/mL for UCHL1).

Statistics

Statistics and plots were generated using GraphPad Prism 8 software (version 8.0.0). The normality of the distributions was assessed graphically and using the Shapiro–Wilk test. In the case of a non-Gaussian distribution, the Mann–Whitney U test was used for one-to-one comparisons, and ordinary one-way Analysis Of Variance (ANOVA) (non-parametric Kruskal–Wallis test) for multiple comparisons. In the case of a Gaussian distribution, the t-test was used for one-to-one comparisons or one-way ANOVA (parametric Dunnett's multiple comparison test) for multiple comparisons. Data are reported as

the mean $\pm$ standard deviation (SD). The statistical tests adopted a two-tailed α level of 0.05.

Statistical tests, inclusion or exclusion of outliers, post-hoc tests are presented in supplementary Table 1. For behavioral studies, identification of outliers was performed post hoc using Iterative Grubbs ($\alpha=0.1$) and outliers were removed from data analysis.

Results

The tools

Constructs encoding VHH mediate effectively the intra or extracellular localization

Our VHHs were designed for either intracellular expression (intraVHH, Fig. 1A) or secretion into the extracellular environment (extraVHH, Fig. 1B) driven by a secretion consensus sequence. IntraVHHs are fused to a mCherry protein, whereas extraVHHs are fused to an interleukin-2 signal sequence (IL2ss) in their N-terminal parts, allowing their secretion, and a Fc portion in their C-terminal parts, to increase their sensitivity and/or affinity [46].

IntraZ70 was detected in the cell lysate of transfected HEK293T cells by immunoblotting with anti-VHH antibodies (Fig. 1C, upper panel). Conversely, as expected, extraZ70 was detected with anti-VHH antibodies (Fig. 1C, upper panel) and anti-Fc antibodies (Fig. 1C, lower panel) in both the cell lysate and the media. Intra and extraVHHs were detected at the expected molecular weights of 40 kDa (VHH=14 kDa, mCherry=26 kDa) and 42 kDa (IL2ss-VHH=17 kDa, mFc=25 kDa), respectively. This confirms the targeting of VHHs and demonstrates that VHH secretion into the extracellular space is driven by the secretion consensus sequence present in extraVHH. Following viral vector delivery into young Tg30 mice, the presence of viral DNA episome was confirmed by qPCR in the hippocampus of mice (Fig. 1D), which was further confirmed by VHH immunofluorescence detection on sagittal brain slices at these time points (Fig. S3). Finally, a specific colocalization between calreticulin (purple), an endoplasmic reticulum marker, and extraVHH (green) confirmed a secretory pathway for its extracellular localization (Fig. 1E). Taken together, these experiments verified the long-term

production of Z70 VHHs following viral vector delivery and that their intended localization was achieved. Similar conclusions were drawn for the intended controls of our experiments, namely anti-GFP VHHs (intraCtrl and extraCtrl VHHs, Fig. 1C).

The safety

VHH safety

Z70 targets the epitope PHF6, which is found in both human and murine proteomes, potentially disrupting normal tau function in mice. A long-term multi-assay was designed to evaluate potential Z70 adverse events in WT mice. Several outcome measures were analyzed: 1) body weight gain, 2) brain imaging (MRI and PET-FDG), 3) parenchymal and peripheral biomarkers and 4) behavior. As controls, we used AAV2/9 vectors expressing the GFP protein and empty AAV vectors. Data relating to the GFP protein should be viewed with caution, as its overexpression in cells can induce undesirable cellular events [47]. In multivariate statistical analyses, the empty vector is used as a control.

- 1) *Body weight gain*—AAV2/9 expressing intraZ70 or extraZ70 was injected into the hippocampus of 1-month-old WT mice and the mice were sacrificed 9 months later (Fig. 2A). We also injected AAV2/9 which does not express any protein, called AAV2/9, or expressing GFP as controls. No difference in weight gain was observed among groups, suggesting the safety of protein overexpression procedures on the global metabolism in WT mice (Fig. 2B).
- 2) *Brain imaging*—The mice also underwent in vivo MRI to quantify parenchyma volume in the hippocampus and visual cortex, regions where VHHs are most highly expressed (Fig. S1B). GFP overexpression affected the volume of a few regions (Fig. 2C, AAV2/9 versus (vs.) GFP, medium per group of p values indicating changes compared to the AAV2/9 group), with brain atrophy quantified in the hippocampus and the visual cortex (Fig. 2D, H, white and green bars). Conversely, no major changes were observed in the brain after injection of intra- or extraZ70 (Fig. 2C, AAV2/9 vs. ExtraZ70, medium per group of p values indicat-

(See figure on next page.)

Fig. 2 VHH Safety: Brain imaging—(A) Scheme of the experimental design created with Biorender.com. (B) Mice were weighed monthly and the results are expressed as weight gain (= % weight compared to weight before viral vector injections). (C) 8 months after injection, MRI scans were used to determine the following image aspects: 1) brain volume: the statistical difference between mice injected with AAV2/9 and mice injected with GFP, intraZ70 or extraZ70 is shown (left to right). These statistical values are color-coded on the NUS template used for segmentation. The brain volumes expressed in mm^3 are shown for the hippocampus (D) and for the visual cortex (H). 2) DTI signals (FA and MD) were quantified in the hippocampus (E, F respectively) and the visual cortex (I, J respectively). 3) Glucose uptake (FDG-PET) was also evaluated in the hippocampus (G) and visual cortex (K). Some examples of MBP and CNPase proteins detected by SDS-PAGE in hippocampal lysate are shown (L). Quantifications were done from all mice (M and N respectively). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ****: $p < 0.0001$

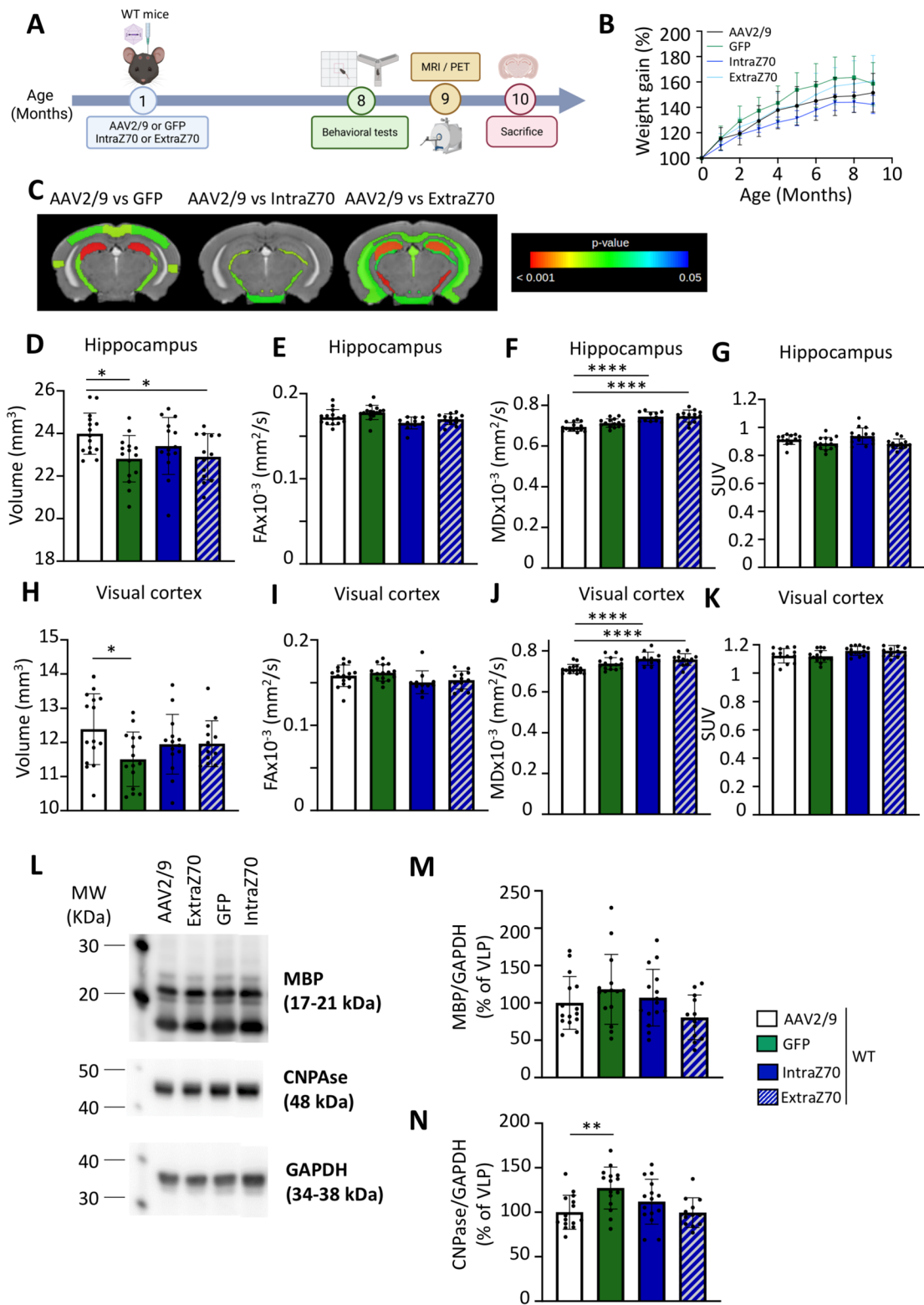


Fig. 2 (See legend on previous page.)

ing changes compared to AAV2/9 group), except for a significant atrophy of the hippocampus in the mice expressing extraZ70 (Fig. 2D, white and hatched blue columns).

Next, we used diffusion tensor imaging (DTI), a technique used to assess the microstructural properties of white matter, based on the water diffusivity. The diffusion of water in an unrestricted medium, and therefore identical in all directions, is called isotropic. This diffusion is affected by the presence of barriers, such as myelin fibers, resulting in a modification of isotropy, called anisotropy. Anisotropic water diffusion can be specified using indices of water diffusion (RD and LD), which define FA. FA is highly sensitive to microstructural changes that allow to determine how far the shape of the diffusion tensor deviates from spherical, but does not specify the type of changes (e.g., RD or LD) [48].

These key DTI metrics then provide insight into axonal integrity and were assessed in the hippocampus and visual cortex. A slight but significant increase of RD and LD was observed in the hippocampus and visual cortex of WT mice injected with VHHs compared to WT-AAV2/9 (Fig. S4). Interestingly, the absence of FA changes in both regions (Fig. 2E, I) indicated the preservation of axon integrity. To confirm the absence of a demyelination process due to oligodendrocyte dysfunction, two myelin proteins, myelin basic protein (MBP) and the early myelin 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), were quantified by biochemical assay (Fig. 2L-N). While a significant increase in MBP was observed in the GFP group, neither CNPase nor MBP was affected after intra- or extraZ0 expression compared to AAV2/9.

In addition, we used ^{18}F -fluoro-deoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) to evaluate cerebral glucose metabolism. This technology provides high spatial resolution of altered neural activity and reflects overall brain metabolism [49]. No differences in glucose uptake were observed between groups compared to WT-AAV2/9 (Fig. 2G, K) suggesting a global neuronal integrity.

3) *Parenchymal and peripheral biomarkers*- To confirm the absence of neuronal damage and to evaluate any other cellular brain lesions, we quantified specific markers of neuronal cells (Tau, NeuN, NfL, PSD95, Snap25), and glial cells (GFAP, Iba1, markers of astrocytes and microglia, respectively) in the parenchyma using brain lysate but also in the peripheral plasmatic system. We also added ubiquitous functional markers to assess intracellular degradation (LC3b, UCHL1) and cellular stress (pEI2 α , ATF4). No neuronal damage was found with stable levels of (TauCter, Fig. 3A), NeuN (Fig. 3B) and synaptic markers (PSD95, Snap25, Fig. 3C, D). We also examined the inflammatory response that may be associated with VHH delivery. The level of GFAP (Fig. 3E) in the parenchyma shows no difference, whereas Iba1 is increased in mice injected with intra- and extraZ70 compared to the AAV2/9 group (Fig. 3F). In the hippocampal anatomy, this increase is confirmed only for extraZ70 (Fig. 3J). Importantly, the VHH treatment has no effect on intracellular degradation pathways (LC3b, Fig. 3G) and the cellular integrated response to stress (pEI2 α , ATF4, Fig. 3H, I).

Finally, peripheral markers were also quantified from plasma by using ultra-sensitive and multiplexed immunodosage based instruments, a technology already validated for human biological fluids. No release of tau (Fig. 3K), NfL (Fig. 3L), GFAP (Fig. 3M) and UCHL1 (Fig. 3N) was noticed.

Together, the evaluation of parenchymal and peripheral biomarkers dosages suggests that the injection of viral vectors encoding intraVHH or extraVHH was safe overall, with no significant risk of neuronal death, axonal or synaptic loss, cellular stress or inflammation.

4) *Behavior*—To confirm this conclusion, two behavioral assays were performed (anxiety and spatial memory tests using OpenField and Y-maze, respectively). First, no problems with locomotion and velocity were observed (Fig. 4A-D). Regardless of the group, mice spent significantly more time near the wall than in the center of the arena (Fig. 4E, OpenField), but also in the new arm in the Y-maze assay (Fig. 4F), as

(See figure on next page.)

Fig. 3 VHH Safety: Parenchymal and peripheral biomarkers- Brain lysates of 10-months-old WT mice were used to quantify hippocampal biomarkers by Western-blotting (A-I): TauCter (A), NeuN (B), PSD95 (C), Snap25 (D), GFAP (E), Iba1 (F), LC3b (G), pEIF2 α (H), ATF4 (I). The list of antibodies used is listed in Table 1. Antibodies were validated against positive and negative controls, and some examples of mouse samples are shown (Fig. S5). Representative images of Iba1 immunostaining in the hippocampus are shown. Scale bars are indicated in the figure. Zoom areas (small black insert) are shown in the bottom right corner (large black insert) (J, left panels). Iba1 immunostaining was quantified blindly using Mercator software. Results are expressed as the percentage of Iba1-positive area relative to control (J, right panels) Plasma dosage using the Simoa technology are shown: Tau (K), NfL (L), GFAP (M) and UCH-L1 (N). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

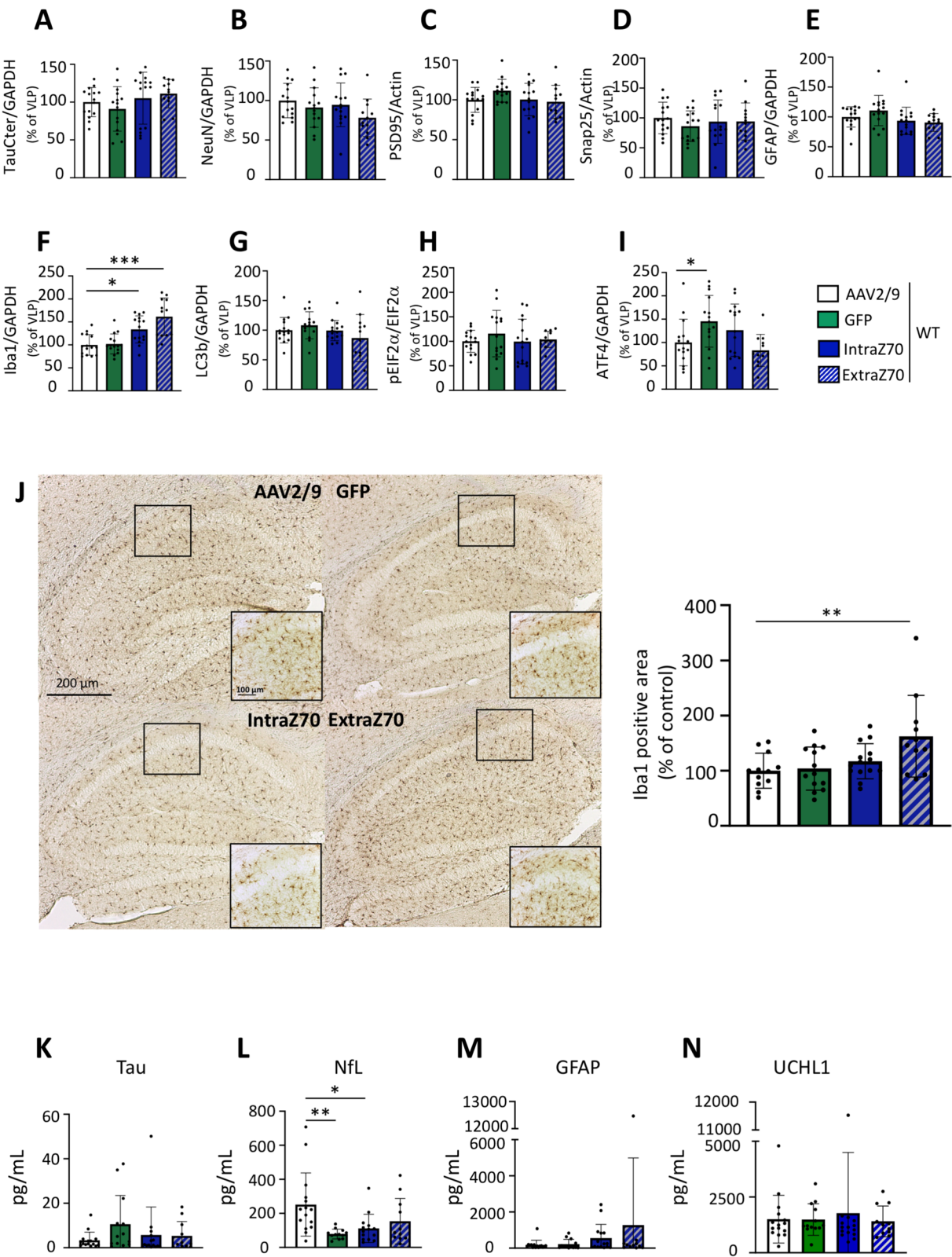


Fig. 3 (See legend on previous page.)

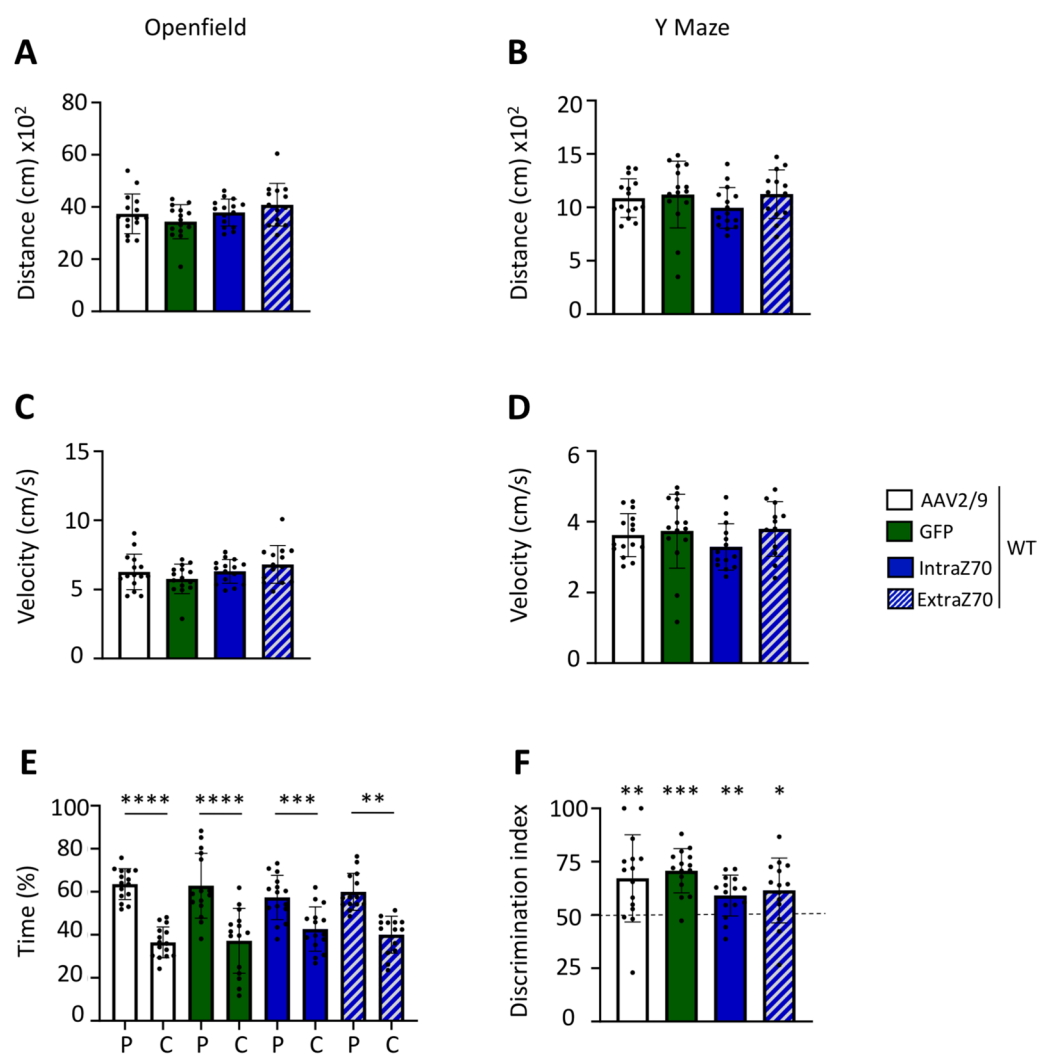


Fig. 4 VHH Safety: behavioral assays- The distance traveled (**A, B**) and velocity (**C, D**) of 9-month-old WT mice were monitored in a 10 min OpenField area and in a 5 min Y-maze assay. **E** OpenField test. Time near the wall (*P*=periphery) or in the center (*C*) is reported relative to the total time in the arena (10 min). **F** Y-maze test. Time in new arm was reported as the sum of time in new and other arms in the first minute. The *p* value is related to the % of time spent in the new arm in comparison to 50% (dotted line). *: *p* < 0.05; **: *p* < 0.01; ***: *p* < 0.001; ****: *p* < 0.0001

would be expected for normal behavior. Thus, consistent with the molecular and cellular safety, no behavioral defect was observed.

The efficacy
Effect on behavior of long term intra- and extraZ70 expression

In the absence of safety concerns, we next evaluated the efficacy of VHHs in reducing tau pathology. Viral vectors encoding VHHs constructs (intraZ70, extraZ70, intraCtrl

(See figure on next page.)
Fig. 5 Behavioral tests—(A) Scheme of the experimental design created with Biorender.com. The motor abilities of 8-month-old Tg30 mice injected with intra- or extraVHHs, or WT mice injected with AAV2/9, were controlled by distance traveled (B, C) and the velocity (D, E) in a 10 min OpenField area or in a 5 min Y-maze assay. **F** OpenField test. Time spent near the wall (*P*=periphery) or in the center (*C*) is reported relative to the total time in the arena (10 min). **G** Y-maze test. Time in the new arm is reported relative to the sum of time in the new and other arms in the first minute. The *p* value is related to the % of time spent in the new arm in comparison to 50% (dotted line). **F-G** GraphPad Prism 8 software (version 8.0.0) was used to exclude outliers from the analysis. *: *p* < 0.05; **: *p* < 0.01; ****: *p* < 0.0001

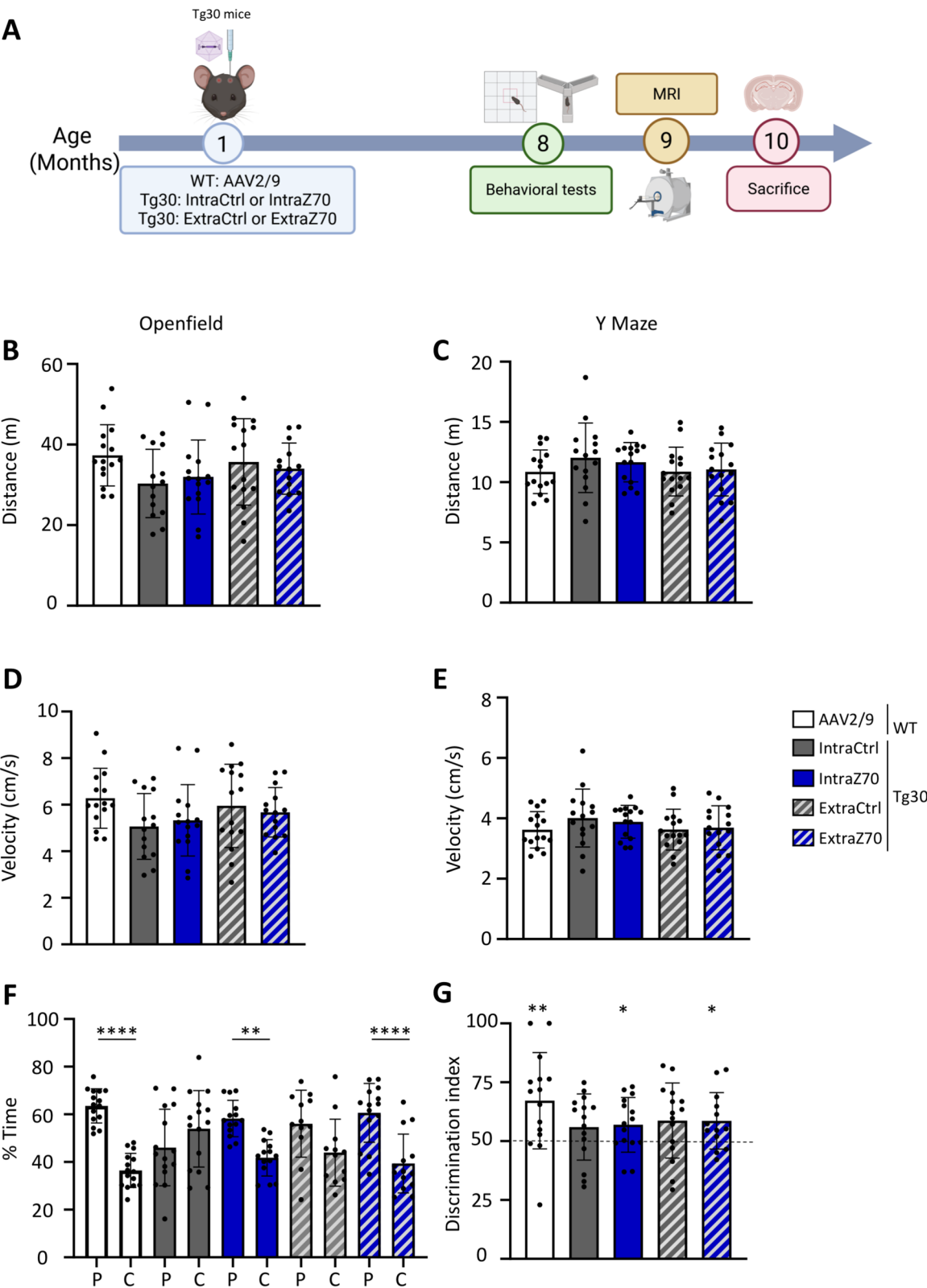


Fig. 5 (See legend on previous page.)

or extraCtrl) were injected into the brain of Tg30 or AAV2/9 was injected into the brain of WT mice as a control. Three outcomes were evaluated: 1) mouse behavior, 2) brain imaging, and 3) tau lesions (Fig. 5A).

We first assessed anxiety and spatial memory eight months after injection. First, we verified the absence of locomotor and velocity impairments in both the Open-Field (Fig. 5B, D) and the Y-maze (Fig. 5C, E). Tg30-VHH mice exhibited similar travel patterns to WT-AAV2/9 mice in all tests, allowing us to proceed with further behavioral analyses. WT-AAV2/9 mice showed normal behavior by spending significantly more time near the walls (periphery) than in the center (Fig. 5F, white bars) in the open field. In contrast, Tg30 control groups (intraCtrl and extraCtrl) showed no preference between the two areas (Fig. 5F, gray and hatched gray bars). Similar to WT-AAV2/9 mice, Tg30 mice injected with either intraZ70 or extraZ70 spent more time near the walls (Fig. 5F, blue), indicating recovery. We also assessed short-term spatial memory during the test phase of the Y-maze. As expected for normal behavior, WT-AAV2/9 mice showed a significant discrimination index and spent more time in the novel arm (Fig. 5G, white bar) whereas mice injected with intraCtrl or extraCtrl showed no preference for the novel arm (Fig. 5G, grey and hatched gray bars). However, mice expressing intraZ70 and extraZ70 showed a significant discrimination index (Fig. 5G, blue and hatched blue bars). The effect on memory is slight and it is difficult to conclude about improvement since no significant difference was found between groups.

Taken together, these tests demonstrated that injections of intraZ70 and extraZ70 restore normal mouse behavior in the OpenField task and maintain safety in all behavioral tests.

Prevention of brain atrophy with intra- and extraZ70

Eight months after injection, the mice underwent MRI scans to evaluate total brain volume. Both the WT-AAV2/9 vs. Tg30-intraCtrl and WT-AAV2/9 vs. Tg30-extraCtrl comparisons showed an alteration of the brain volume in Tg30 mice in several regions (Fig. 6A), quantified as a brain atrophy in the hippocampus and visual cortex (Fig. 6B, C, white, grey, and hatched grey bars). Notably, the volume of these regions in Tg30 mice expressing extraZ70 are not significantly different from those observed in the control, WT-AAV2/9 mice (Fig. 6B, C, white, blue hatched bars) and a similar effect was observed with intraZ70, except in the hippocampus (Fig. 6B-C, white and blue bars).

Taken together, these data suggested that both intracellular and extracellular targeting of tau prevents brain atrophy in Tg30 mice.

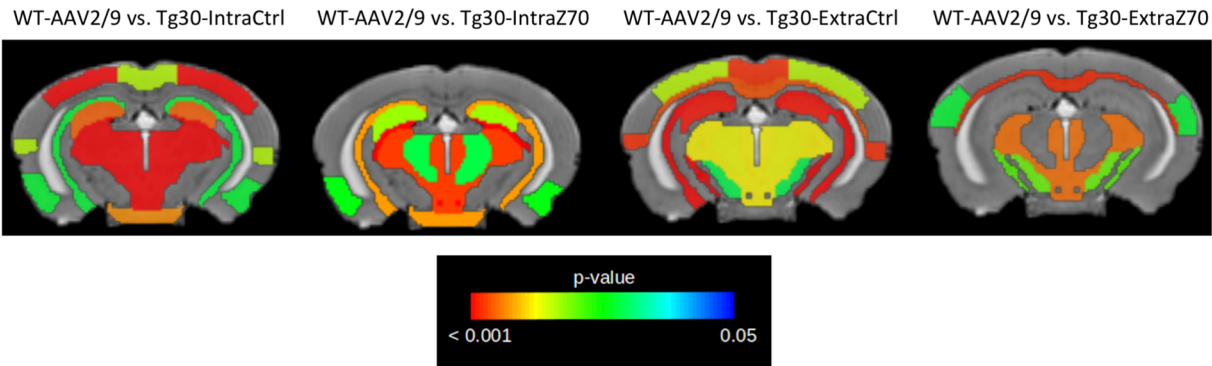
Targeting intraTau in a chronic model of tau pathology reduces tau hyperphosphorylation

Given the mode of action of Z70 in preventing tau seeding [22], it is reasonable to hypothesize that the recoveries observed in behavioral tests and brain volume may be the consequence of reduced tau pathology. Immunological tools are available to distinguish the different biochemical forms of tau and to characterize pathological changes. We therefore assessed tau immunoreactivity using various antibodies: AT8 labels hyperphosphorylated tau [50], whereas MC1 labels conformational changes [51] and AT100 labels aggregated tau [52]. Contrary to extraZ70, intraZ70 can reduce AT8 immunoreactivity in the hippocampus compared to intraCtrl (Fig. 7A, B), but not in the amygdala (Fig. S6A, B). These effects correlated with the stability of the AAVs episome in the hippocampus (Fig. 1D), which drives VHH expression in this brain area (Fig. S3), but not in the amygdala which contains hyperphosphorylated tau (Fig. S6B). Intracellular superimposition of AT8 phosphoTau (Fig. 7C, green) and VHH (Fig. 7C, purple) profiles showed target engagement between intraZ70 and AT8 in the hippocampus, with no specific co-localization between intraCtrl and AT8 phosphoTau (Fig. 7D). To better characterize the tau species targeted by the VHHs, MC1 and AT100 immunoreactivities were also evaluated in the hippocampus, but no significant effect of intraZ70 was detected (Fig. 7E, F respectively). These data suggest that intraZ70 binding to intracellular tau drives reduction of tau lesions.

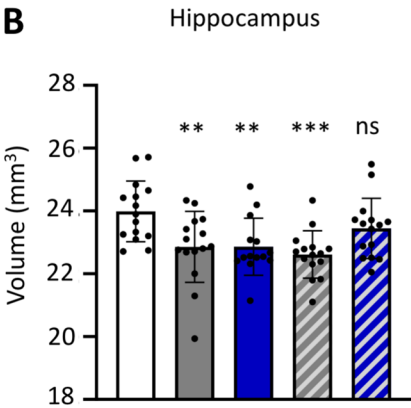
ExtraZ70 reduces tau pathology in a mouse model of tau seeding

Because extraZ70 was unable to reduce tau hyperphosphorylation in the chronic transgenic Tg30 model (Fig. 7), we speculated that the high intracellular accumulation of pathological tau at 8 months in this chronic transgenic model of tau pathology might not be offset by extraZ70, which targets extraTau species. To address this hypothesis, we tested the extraZ70 in our acute model of tau seeding, in which tau pathology is induced by intraparenchymal injection of human AD brain homogenate into young transgenic mice [53]. We injected lentiviral vectors expressing extraZ70 or extraCtrl into the hippocampus of 1-month-old Tg30 and inoculated AD brain material 15 days later (Fig. 8A). Lentiviral vectors are non-diffusing vectors, thus concentrating the VHH action at the injection site as previously shown [54]. One month later, animals were sacrificed and hyperphosphorylated tau was detected on brain slices using the AT8 antibody (Fig. 8B). Quantification of tau pathology throughout the hippocampus showed a decrease with extraZ70 compared to the extraCtrl (Fig. 8C). These data suggest that extraZ70

A



B



C

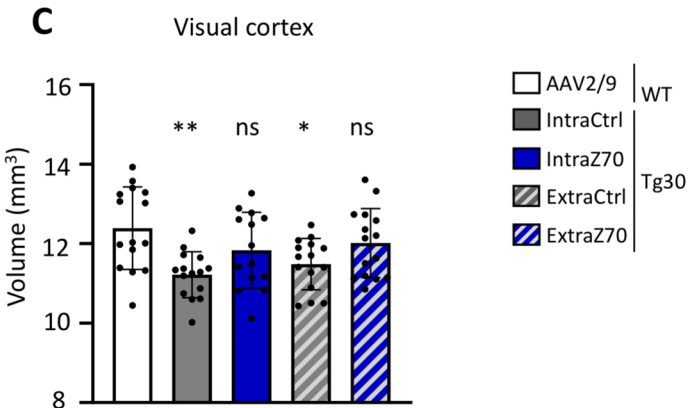


Fig. 6 MRI-brain volume evaluation- (A) MRI scans taken 8 months after injection were used to determine the statistical difference in the brain volume between AAV2/9-injected WT mice and Tg30 mice injected with intraCtrl, intraZ70, extraCtrl, or extraZ70 (left to right). These statistical values were color-coded on the NUS template used for segmentation. The brain volume expressed in mm3 is shown for the hippocampus (B) or visual cortex (C), quantified by MRI. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ns: non-significant

is effective in reducing the spread of nucleating agents present in the extracellular medium.

Discussion

The development of therapies to combat AD is still a real challenge today, as the drugs currently on the market have low efficacy, and many of phase 3 clinical trials in

the last 25 years have been negative. Tau-based immunotherapy is mainly based on the prion-like paradigm, in which there is first an induction of misfolding of the physiological tau protein by pathological species, called seeding, leading to intraTau pathological species. Secondly, a cell-to-cell transfer of a misfolded tau species leads to the presence of extraTau pathological species

(See figure on next page.)

Fig. 7 Tau pathology in aged Tg30, a chronic model of tau pathology expressing intraZ70 or extraZ70- (A) Illustration of AT8 tau lesions in hippocampal sections. Scale bars are indicated in the figures. Immunoreactivity is detected and quantified using the AT8 antibody in the hippocampus (B). Immunohistofluorescence was done on sagittal brain sections to visualize phosphoTau (AT8, green) and VHH (purple). The specific location of phosphoTau and intraZ70 (C) or intraCtrl (D) was quantified across the cells (left profile). Fluorochrome overlays are analyzed in cells and illustrated on the right part of the figure. Quantification of MC1 (E) or AT100 (F) immunostaining in the hippocampus is also shown. For B, E and F, quantifications were done using Mercator software. Results are presented as the percentage of antibody stained surface relative to the control. **: $p < 0.01$

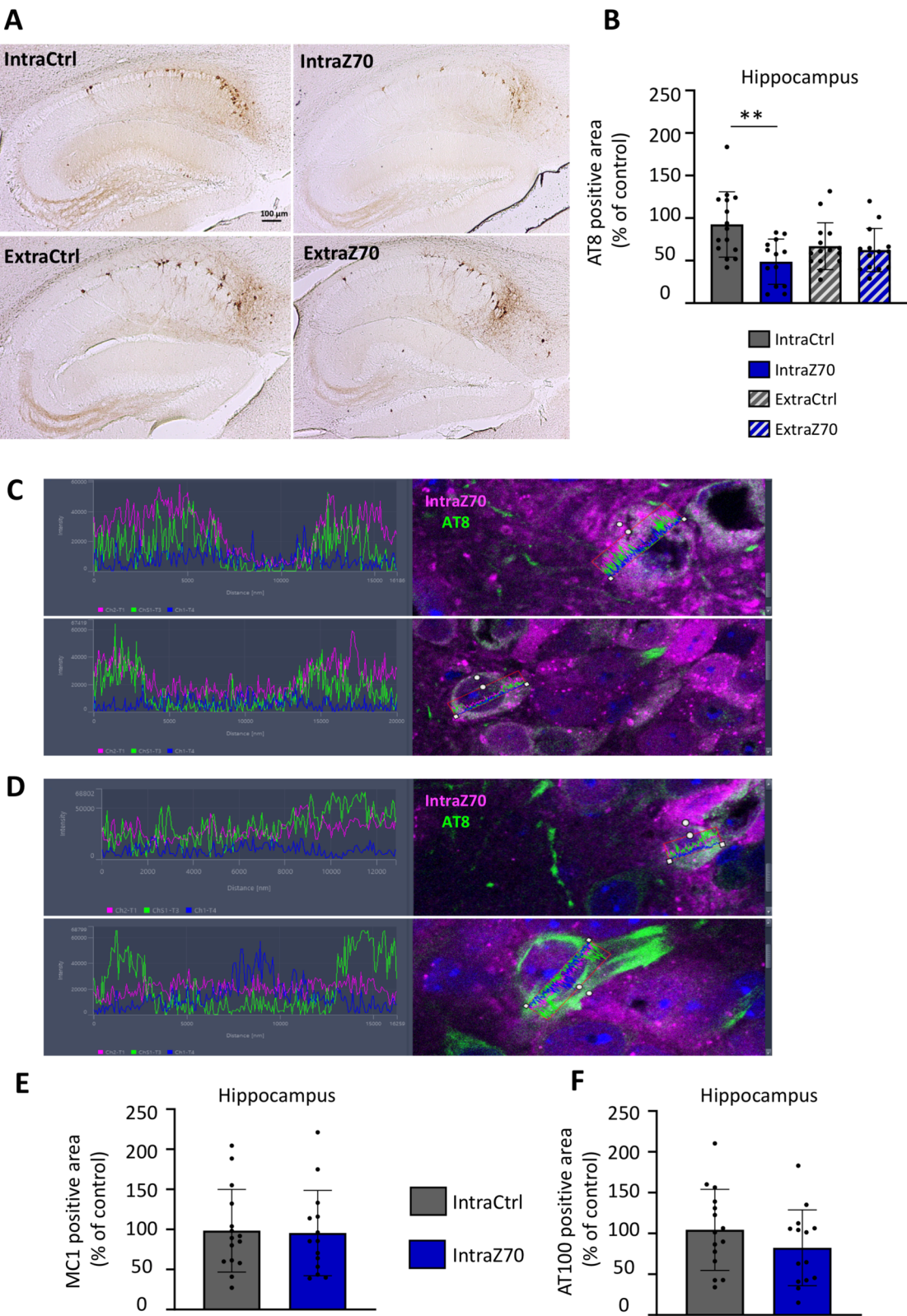


Fig. 7 (See legend on previous page.)

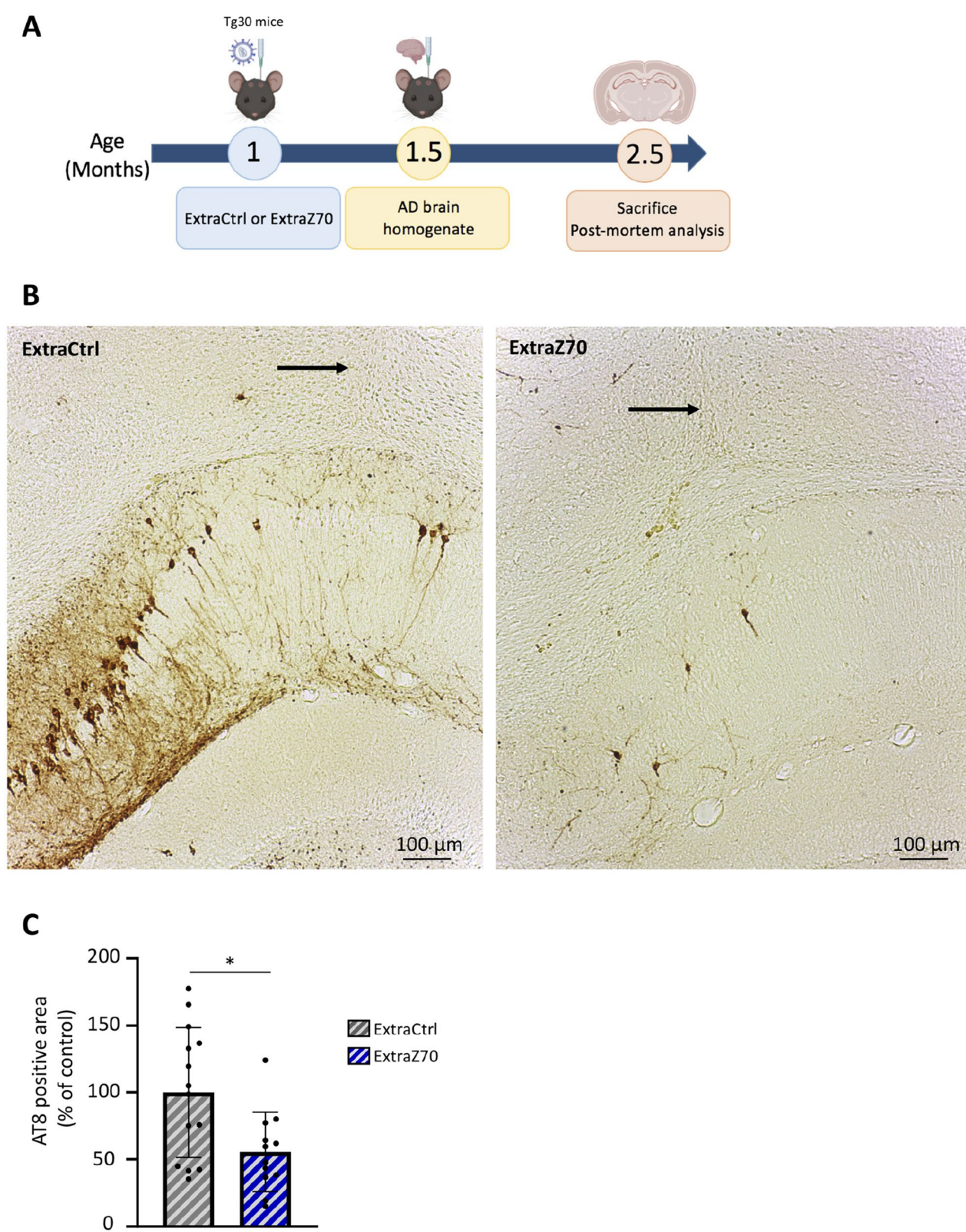


Fig. 8 Tau pathology in young Tg30, an acute in vivo model of tau seeding expressing extraZ70- **(A)** Scheme of the experimental design created with Biorender.com. **B** Representative images of mice with AT8 immunostaining (AT8 intensity closest to the group mean value). The needle track is indicated with a black arrow. Scale bars are indicated in the figure. **C** AT8 immunoreactivity in the whole hippocampus were blindly quantified using the Mercator software. Results are expressed as the percentage of AT8-positive area relative to control. *: $p < 0.05$

in the interstitial fluid surrounding the cells. Both intra- and extraTau are very promising targets because blocking tau seeds inside or outside the neurons could slow the specific hierarchical progression of AD, in which certain regions of the brains are affected in a particular order.

These hierarchical pathways have also been described in primary tauopathies such as progressive supranuclear palsy [55–59], argyrophilic grain disease [60] and Pick disease [61]. However, the relevance of extending the prion-like concept to these other tauopathies is still under debate [8, 62]. Indeed, while specific tau peptides are abundant in the cerebrospinal fluid (CSF) of AD, their levels are relatively low and close to control groups in progressive supranuclear palsy and dementia with Lewy body [30, 63], suggesting that tau secretion are not necessarily common features of all tauopathies, a point that should be considered in the future when designing appropriate therapies. Thus, targeting intracellular tau (intraTau) may be useful in the context of these primary tauopathies, whereas developing tools to block both intra- and extracellular tau may be more efficient in the context of AD.

In this study, we investigated the ability of two VHHs to reduce tau pathology through tau target engagement inside hippocampal neurons or in the interstitial fluid. To this end, we designed two VHH constructs. One mediated the intracellular expression of VHH (Intra-VHH), and the other mediated its secretion by the addition of an IL2ss and Fc portion of murine IgG2a (ExtraVHH). As expected, our data showed that only extraVHHs seem to be secreted and not intraVHHs. Contrary, Holtzmann and collaborators shown that ScFv when expressed in the cells may be secreted with some variabilities among them [13]. Also, the extraCtrl VHH is present in greater quantities in the extracellular medium than the extraZ70, as detected both with the anti-VHH and anti-Fc antibodies. This suggests that it is either secreted more efficiently or has a longer extracellular half-life, indicating some variability in single-domain antibody secretion, as reported by Holtzmann and collaborators for ScFv [13]. Despite this difference, the extraZ70 performs well in comparison to its extraCtrl VHH. Although, a fraction of extraVHHs is detected inside the cells (Fig. 1C), it is probably confined to the vesicles of the ER (Fig. 1E), preventing intra-cellular tau binding. In this configuration, the extraVHH resembles an antibody, albeit a small one, that can trigger the immune response, whereas the intraVHH is a tau mini-protein binder rather than an antibody. The additional Fc also provides a multivalent configuration, with two VHHs, which can provide a higher apparent affinity (also referred to as “avidity”) than the monovalent form.

Both VHHs bind the tau peptide PHF6 [22]. The PHF6 hexapeptide $_{306}\text{VQIVYK}_{311}$ is capable of inducing tau aggregation through the formation of β -sheet structures [31], observed in early filamentous assemblies [33], and tau proteoform analyzes have shown the presence of peptides containing this motif in the CSF of AD patients [30]. Therefore, this tau epitope is not only a suitable target for intracellular but also for extracellular immunotherapies.

The development of these anti-tau VHHs into new therapeutic modalities requires not only proof of efficacy, but also evidence of long-term stability and safety. In fact, the PHF6 epitope which is recognized by the VHH Z70 used in this study is not specific for a pathological form of tau, as it is also present in native tau. As tau is a pleiotropic protein with multiple functions in the cell [64], controls were needed to test the safety of the delivered anti-tau VHHs. To this end, a long-term kinetic study was performed in WT mice. Whereas considering Sex As a Biological Variable (SABV) is of interest, this study grouped male and female mice together for ethical reasons, primarily to minimize the number of animals sacrificed. This approach also ensured statistical power, particularly for our imaging and behavioral assays. It should be noted that a few mice died during the continuous anesthesia procedure for brain imaging data acquisition and then we thought that this adverse effect is related to the isofluorane administration and not to VHHs. Indeed, the global metabolism of the mice was unaffected, and among parenchymal and peripheral markers, only Iba1 was elevated after intra- and extraVHH administration, suggesting the induction of neuroinflammation. This inflammation was expected with extraVHH because its Fc part could activate microglia by binding to Fc receptors that are highly expressed on brain macrophages [65], and Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, and Fc γ RIIIa are further upregulated in AD microglia [66]. Indeed, studies investigating IgG antibody-tau immune complexes show that clearance can be achieved by Fc γ R-mediated endocytosis in primary mouse microglial cultures [67, 68]. Conversely, the Iba1 immunoreactivity observed with intraZ70 (but not validated by IHC) was not expected, but could be associated with the small DTI changes observed. However, this mild inflammation does not appear to be detrimental, as no neuronal damage or side effects on the brain volume and mouse behavior were observed with either intra- or extraVHH administration. This may be due to the fact that the DTI changes are small (fold enhancements ranging from 1.02 to 1.10 in our DTI metrics) compared to, for example, those described in a traumatic axonal injury model (fold enhancements ranging from 1.3 to 1.5) [69] or in a tauopathy model (fold enhancements ranging from 1.14 to

1.33) [70]. Accordingly, the absence of glucose metabolism variation indicated a non-inflamed state of the brain.

The potential of VHHs to slow down tau pathology was then investigated. To effectively reduce tau pathology in the most affected cells of the hippocampus, we compared various AAVs for their broad distribution and selected AAV2/9, which drives VHH expression under a CMV promoter. Progress towards clinical applications may require a less invasive delivery route than intracranial injection. Advances in AAV engineering are promising in this regard and some have demonstrated the ability to transduce the brain after peripheral intravenous administration [71, 72].

Using a series of indicators, both in a chronic and long-term tau transgenic mouse model (Tg30) [38] and in an acute seeding model with injections of human brain homogenates from AD patients [22], we evaluated the intra- and extraVHH strategies to reverse pathological phenotype. IntraVHH, was able to reduce neuronal tau hyperphosphorylation, brain atrophy and mouse behavior despite the continuous accumulation of pathological tau in the chronic and long-term tau transgenic mouse model (Tg30) [38]. It is noteworthy that the markers AT100 and MC1, commonly used as indicators of the presence of tau fibrils, were not attenuated by intra-VHHs, but the recovery of several other indicators of pathology were factual indications of a reduction in tau toxicity. This adds to the discussion that the tau fibrils alone are not, to some extent, the only toxic tau species [73–75]. The intraVHHs are rather likely to act by binding to soluble tau species and small oligomers, and we have demonstrated this target engagement (Fig. 7D, E) preventing prion-like conversion into a pathological tau in a mini-chaperone-like manner [22, 76, 77]. Such a mode of action is independently proposed for other anti-tau VHHs more recently developed that similarly bind the tau PHF sequences [24].

ExtraVHH, which targets tau in the interstitial fluid, reduced most of the pathological phenotype but, as expected, did not avoid the intraneuronal tau pathology in the long-term Tg30 model. The extraVHH is more likely to be involved in the inflammatory response, stimulating clearance of the pathological tau species. Alternatively, VHH Z70 has been shown to reduce cellular uptake of tau, in primary neuronal cultures [78], which may also be a mode of action of the extraVHH.

In the chronic model (8 months-old mice), there is an intra-neuronal accumulation of tau pathology coming from the continuous expression of tau transgene that cannot be blocked by the extraZ70. In the acute model however [53], the intra-neuronal lesions are coming from the seeding of soluble transgenic endogenous human tau by the AD human seeds captured by the neurons.

ExtraVHHs present in the interstitial fluid may then block part of the pathological tau species in this case.

Thus, the intra- and extraVHHs used in this study both reduced the tau pathology in a similar manner by acting on the prion-like mechanisms of the disease, albeit in different and complementary ways. Evaluating their combined effect is a perspective of interest, as well as improving their properties (such as the affinity for tau; [79]), with the objective of increasing the effect on the various pathology indicators.

Conclusion

Taken together, these results provide proof of concept that anti-tau VHHs can be used to reduce both intra- and extraTau pathology without major adverse effects. They are of great interest for therapeutic applications, not only in AD pathology to target intra- and/or extraTau pathological species, but also in primary tauopathies such as PSP where the pathology is mainly intracellular. They are also of great interest for research, in view of understanding the complex mechanisms at play to block tau toxicity and/or pathology.

Abbreviations

AAVs	Adeno-Associated Vectors
AD	Alzheimer disease
AP	Antero-posterior
CSF	Cerebrospinal fluid
CT	Computed Tomography
CPNase	2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
DV	Dorso-ventral
EPI	Echo Planar Imaging
ET	Echo Time
ExtraTau	Extracellular tau
FOV	Field of View
FSL	Functional Source License
FA	Fractional anisotropy
PET-FDG	(18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography
GFP	Green Fluorescent Protein
IntraTau	Intracellular Tau
IL2ss	Interleukin-2 signal sequence
LD	Longitudinal diffusivity
MRI	Magnetic Resonance imaging
ML	Medio-lateral
MTBD	Microtubule Binding Domain
ms	Milliseconds
MBP	Myelin Basic Protein
NUS	National University of Singapore
NFD	Neurofibrillary Degeneration
ON	Over-Night
PHFs	Paired-Helical Filaments
PFA	Paraformaldehyde
PCA	Principal Component Analysis
PROTAC	Proteolysis Targeting Chimera
RD	Radial Diffusivity
ROI	Region of Interest
TR	Time Repetition
SUV	Standardized Uptake Values
Tg30	THY-tau30 transgenic mice
VHH	Variable domain of the Heavy chain of the Heavy chain only antibodies
vs.	Versus

WT Wild-Type

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13195-025-01823-6>.

Supplementary Material 1.
Supplementary Material 2.
Supplementary Material 3.

Acknowledgements

We are grateful to M. Tardivel and A. Bongiovanni for their help on the Zeiss confocal microscope, from the Photonic Microscopy Core BioImaging Center (BiCeL). We also thanks Nicolas Durieux and Yann Lepage from the Lille In vivo Imaging and Functional Exploration-LIIFE, for their technical help in brain imagery (MRI and FDG-PET) processing. Thanks to Claire Regost and Agathe Launay for their help in arsenic treatment and synaptosome purification respectively and to Marie Oosterlynck for her professional writing services.

Authors' contributions

Investigation: R.C., S.L., S.B. & M.B. Methodology: R.C., L.B., R.C. & C.L., J. M., F.A. (brain imaging). Formal analysis: R.C., M.C., C.L. & F.A. (brain imaging analyzes). Resources: C.A.M. and B.A. (selection of the AD cases and sampling, Lille NeuroBank). Validation: R.C., L.B. & M.C. Visualization: R.C. & M.C. Supervision: I.L., M.C. & L.B. Conceptualization: R.C., E.D., C.D., I.L., L.B. & M.C. Project administration: I.L. & L.B. Funding acquisition: I.L. & L.B. Writing-original draft: R.C. & M.C. Writing-review and editing: R.C., E.D., C.D., I.L., L.B. & M.C.

Funding

This project was partially funded by the European Union (HORIZON-MSCA-2022-DN-01, Project TAME, GA101119596), the Rainwater Charitable Foundation & Alzheimer's Association (Project T-PEP-23-969176) and grants from the National Research Agency (ANR, France): LabEx DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's Disease, ANR-11-LABX-01) & TonIC (ANR-18-CE44-0016), Région Hauts de France (StartAIRR BONUS DRESS-2020-023479). Our laboratories are also supported by LiCEND (Lille Centre of Excellence in Neurodegenerative Disorders), the Métropole Européenne de Lille, the Conseil Régional du Nord and the European Union (I-SITE, TUNABLE).

Data availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was performed in accordance with French and European Community rules. The experimental research was performed with the approval of an ethics committee (agreement APAFIS #43474-2023050714441306 v6) and follows European guidelines for the use of animals.

Competing interests

E.D., C.D., I.L. and L.B. are the inventors of a patent (WO2020/120644A1) that covers the use of VHH Z70 and VHHs derived from it. The remaining authors declare no competing interests.

Author details

¹University Lille, Inserm, CHU-Lille, U1172 - LiNCog - Lille Neuroscience & Cognition, Lille F-59000, France. ²University Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41-UAR 2014-PLBS, Lille F-59000, France. ³University Lille, CHU-Lille, CRB/CIC1403, Centre de Ressources Biologiques du Centre d'Investigation Clinique, Lille, F-59000, France. ⁴CNRS EMR9002 BSI Integrative Structural Biology, Lille F-59000, France. ⁵University Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Risk Factors and Molecular Determinants of Aging-Related Diseases, Lille F-59000, France.

Received: 15 May 2025 Accepted: 16 July 2025

References

- Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol*. 2013;12(6):609–22. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).
- Tanner JA, Iaccarino L, Edwards L, Asken BM, Gorno-Tempini ML, Kramer JH, et al. Amyloid, tau and metabolic PET correlates of cognition in early and late-onset Alzheimer's disease. *Brain*. 2022;145(12):4489–505. <https://doi.org/10.1093/brain/awac229>.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(5):362–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.
- Fitzpatrick AWP, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, et al. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature*. 2017;547(7662):185–90. <https://doi.org/10.1038/nature23002>.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, et al. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2012;26(5):1946–59. <https://doi.org/10.1096/fj.11-199851>. doi: fj.11-199851 [pii].
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239–59.
- Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, et al. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999;52(6):1158–65.
- Colin M, Dujardin S, Schraen-Maschke S, Meno-Tetang G, Duyckaerts C, Courade JP, et al. From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol*. 2020;139(1):3–25. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02087-9>.
- Courade JP, Angers R, Mairet-Coello G, Pacico N, Tyson K, Lightwood D, et al. Epitope determines efficacy of therapeutic anti-Tau antibodies in a functional assay with human Alzheimer Tau. *Acta Neuropathol*. 2018;136(5):729–45. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1911-2>.
- Bhadane P, Roul K, Belemkar S, Kumar D. Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease: exploring active and passive vaccine progress. *Brain Res*. 2024;1840: 149018. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.149018>.
- Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5705–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5705>.
- Gallardo G, Wong CH, Ricardez SM, Mann CN, Lin KH, Leyns CEG, et al. Targeting tauopathy with engineered tau-degrading intrabodies. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):38. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0340-6>.
- Ising C, Gallardo G, Leyns CEG, Wong CH, Jiang H, Stewart F, et al. AAV-mediated expression of anti-tau scFvs decreases tau accumulation in a mouse model of tauopathy. *J Exp Med*. 2017;214(5):1227–38. <https://doi.org/10.1084/jem.20162125>.
- Goodwin MS, Sinyavskaya O, Burg F, O'Neal V, Ceballos-Diaz C, Cruz PE, et al. Anti-tau scFvs targeted to the cytoplasm or secretory pathway variably modify pathology and neurodegenerative phenotypes. *Mol Ther*. 2021;29(2):859–72. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2020.10.007>.
- Vitale F, Gilierto L, Ruiz S, Steslow K, Marambaud P, d'Abramo C. Anti-tau conformational scFv MC1 antibody efficiently reduces pathological tau species in adult JNPL3 mice. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6(1):82. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0585-2>.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993;363(6428):446–8. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Kim JY, Sang Z, Xiang Y, Shen Z, Shi Y. Nanobodies: robust miniprotein binders in biomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2023;195:114726. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114726>.
- Zheng F, Pang Y, Li L, Pang Y, Zhang J, Wang X, et al. Applications of nanobodies in brain diseases. *Front Immunol*. 2022;13: 978513. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.978513>.
- De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary

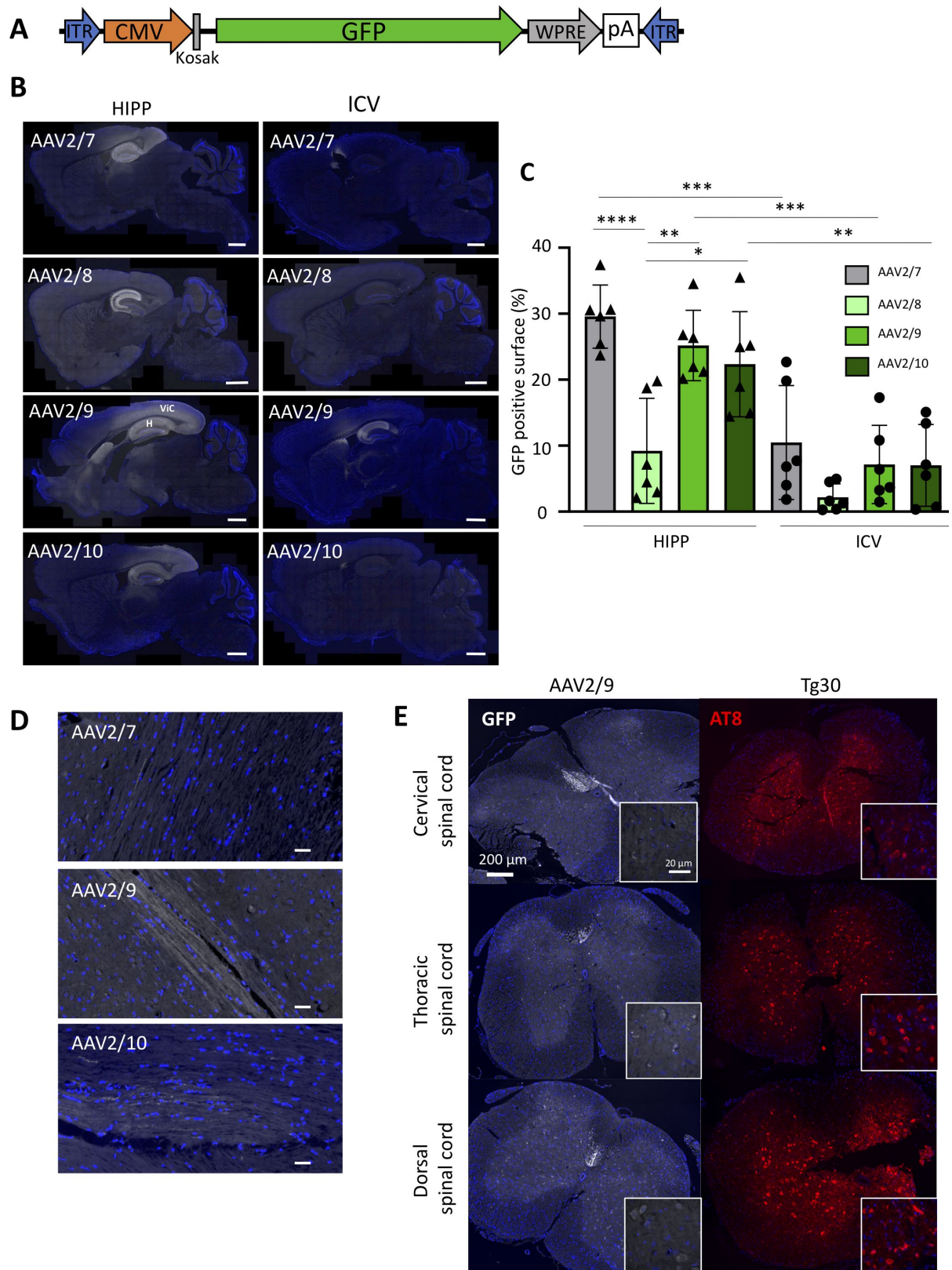
- heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(12):4586–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505379103>.
20. Jiang Y, Lin Y, Krishnaswamy S, Pan R, Wu Q, Sandusky-Beltran LA, et al. Single-domain antibody-based noninvasive in vivo imaging of alpha-synuclein or tau pathology. *Sci Adv*. 2023;9(19):eadf3775. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adf3775>.
 21. Li T, Vandesquille M, Koukoulis F, Duffeffant C, Youssef I, Lenormand P, et al. Camelid single-domain antibodies: a versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J Control Release*. 2016;243:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019>.
 22. Danis C, Dupre E, Zejnelli O, Caillierez R, Arrial A, Begard S, et al. Inhibition of Tau seeding by targeting Tau nucleation core within neurons with a single domain antibody fragment. *Mol Ther*. 2022;30(4):1484–99. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2022.01.009>.
 23. Dupre E, Danis C, Arrial A, Hanouille X, Homa M, Cantrelle FX, et al. Single domain antibody fragments as new tools for the detection of neuronal Tau protein in cells and in mice studies. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(9):3997–4006. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.9b00217>.
 24. Abskharon R, Pan H, Sawaya MR, Seidler PM, Olivares EJ, Chen Y, et al. Structure-based design of nanobodies that inhibit seeding of Alzheimer's patient-extracted tau fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023;120(41):e2300258120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2300258120>.
 25. Nair S, Jiang Y, Marchal IS, Chernobelsky E, Huang HW, Suh S, et al. Anti-tau single domain antibodies clear pathological tau and attenuate its toxicity and related functional defects. *Cell Death Dis*. 2024;15(7):543. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06927-9>.
 26. Benn J, Cheng S, Keeling S, Smith AE, Vaysburd MJ, Boken D, et al. Aggregate-selective removal of pathological tau by clustering-activated degraders. *Science*. 2024;385(6712):1009–16. <https://doi.org/10.1126/science.adp5186>.
 27. Congdon EE, Pan R, Jiang Y, Sandusky-Beltran LA, Dodge A, Lin Y, et al. Single domain antibodies targeting pathological tau protein: influence of four IgG subclasses on efficacy and toxicity. *EBioMedicine*. 2022;84:104249. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104249>.
 28. Scheres SH, Zhang W, Falcon B, Goedert M. Cryo-EM structures of tau filaments. *Curr Opin Struct Biol*. 2020;64:17–25. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.05.011>.
 29. Barthelemy NR, Fenaile F, Hirtz C, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Vialaret J, et al. Tau protein quantification in human cerebrospinal fluid by targeted mass spectrometry at high sequence coverage provides insights into its primary structure heterogeneity. *J Proteome Res*. 2016;15(2):667–76. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01001>.
 30. Barthelemy NR, Gabelle A, Hirtz C, Fenaile F, Sergeant N, Schraen-Maschke S, et al. Differential mass spectrometry profiles of Tau protein in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease, progressive supranuclear palsy, and dementia with Lewy bodies. *J Alzheimers Dis*. 2016;51(4):1033–43. <https://doi.org/10.3233/JAD-150962>.
 31. von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5129–34.
 32. Perez M, Santa-Maria I, Tortosa E, Cuadros R, Del Valle M, Hernandez F, et al. The role of the VQIVYK peptide in tau protein phosphorylation. *J Neurochem*. 2007;103(4):1447–60. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04834.x>.
 33. Lovestam S, Li D, Wagstaff JL, Kotecha A, Kimanius D, McLaughlin SH, et al. Disease-specific tau filaments assemble via polymorphic intermediates. *Nature*. 2024;625(7993):119–25. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06788-w>.
 34. Moutel S, Bery N, Bernard V, Keller L, Lemesre E, de Marco A, et al. NaLi-H1: a universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies. *Elife*. 2016;5. <https://doi.org/10.7554/eLife.16228>.
 35. Weber T. Anti-AAV antibodies in AAV gene therapy: current challenges and possible solutions. *Front Immunol*. 2021;12:658399. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.658399>.
 36. Issa SS, Shaimardanova AA, Solovyeva VV, Rizvanov AA. Various AAV serotypes and their applications in gene therapy: an overview. *Cells*. 2023;12(5). <https://doi.org/10.3390/cells12050785>.
 37. Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Begard S, Brion JP, Hamdane M, et al. 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*. 2006;169(2):599–616. doi: 169/2/599 [pii].
 38. Leroy K, Bretteville A, Schindowski K, Gilissen E, Authélet M, De Decker R, et al. Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. *Am J Pathol*. 2007;171(3):976–92. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070345>. doi: ajpath.2007.070345 [pii].
 39. Holter SM, Garrett L, Einicke J, Sperling B, Dirscherl P, Zimprich A, et al. Assessing cognition in mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2015;5(4):331–58. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo150068>.
 40. Gould TD. Mood and Anxiety-related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests. *Genes, Brain and Behavior*. 2010;9(5):449–544. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00592>.
 41. Tustison NJ, Avants BB, Cook PA, Zheng Y, Egan A, Yushkevich PA, et al. N4ITK: improved N3 bias correction. *IEEE Trans Med Imaging*. 2010;29(6):1310–20. <https://doi.org/10.1109/TMI.2010.2046908>.
 42. Coupe P, Manjon JV, Robles M, Collins DL. Adaptive multiresolution non-local means filter for three-dimensional magnetic resonance image denoising. *IET Image Proc*. 2012;6(5):558–68. <https://doi.org/10.1049/iet-ipr.2011.0161>.
 43. Ma D, Cardoso MJ, Modat M, Powell N, Wells J, Holmes H, et al. Automatic structural parcellation of mouse brain MRI using multi-atlas label fusion. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086576>.
 44. Bai J, Trinh TL, Chuang KH, Qiu A. Atlas-based automatic mouse brain image segmentation revisited: model complexity vs. image registration. *Magn Reson Imaging*. 2012;30(6):789–98. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.02.010>.
 45. Chung S, Pelletier D, Sdika M, Lu Y, Berman JL, Henry RG. Whole brain voxel-wise analysis of single-subject serial DTI by permutation testing. *Neuroimage*. 2008;39(4):1693–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2007.10.039>.
 46. Moutel S, El Marjou A, Vielemeyer O, Nizak C, Benaroch P, Dubel S, et al. A multi-Fc-species system for recombinant antibody production. *BMC Biotechnol*. 2009;9:14. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-14>.
 47. Klein RL, Dayton RD, Leidenheimer NJ, Jansen K, Golde TE, Zweig RM. Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol Ther*. 2006;13(3):517–27. <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2005.10.008>.
 48. Alexander AL, Lee JE, Lazar M, Field AS. Diffusion tensor imaging of the brain. *Neurotherapeutics*. 2007;4(3):316–29. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.05.011>.
 49. Platt B, Welch A, Riedel G. FDG-PET imaging, EEG and sleep phenotypes as translational biomarkers for research in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(4):874–80. <https://doi.org/10.1042/BST0390874>.
 50. Mercken M, Vandermeeren M, Lubke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A, et al. Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol*. 1992;84(3):265–72.
 51. Jeganathan S, Hascher A, Chinnathambi S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem*. 2008;283(46):32066–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805300200>. M805300200 [pii].
 52. Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, et al. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci*. 2002;22(21):9340–51. doi: 22/21/9340 [pii].
 53. Albert M, Mairet-Coello G, Danis C, Lieger S, Caillierez R, Carrier S, et al. Prevention of tau seeding and propagation by immunotherapy with a central tau epitope antibody. *Brain*. 2019;142(6):1736–50. <https://doi.org/10.1093/brain/awz100>.
 54. Dujardin S, Lecolle K, Caillierez R, Begard S, Zommer N, Lachaud C, et al. Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies. *Acta Neuropathol Commun*. 2014;2(1):14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>. doi: 2051-5960-2-14 [pii].
 55. Verry M, Duyckaerts C, Agid Y, Hauw JJ. The significance of cortical pathology in progressive supranuclear palsy. *Clinico-pathological data in 10 cases*. *Brain*. 1996;119(Pt 4):1123–36.

56. Williams DR, Holton JL, Strand C, Pittman A, de Silva R, Lees AJ, et al. Pathological tau burden and distribution distinguishes progressive supranuclear palsy-parkinsonism from Richardson's syndrome. *Brain*. 2007;130(Pt 6):1566–76. <https://doi.org/10.1093/brain/awm104>.
57. Brendel M, Schonecker S, Hoglinger G, Lindner S, Havla J, Blautzik J, et al. [(18F)-THK5351 PET correlates with topology and symptom severity in progressive supranuclear palsy. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:440. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00440>.
58. Radford RAW, Rayner SL, Szwaja P, Morsch M, Cheng F, Zhu T, et al. Identification of phosphorylated tau protein interactors in progressive supranuclear palsy (PSP) reveals networks involved in protein degradation, stress response, cytoskeletal dynamics, metabolic processes, and neurotransmission. *J Neurochem*. 2023;165(4):563–86. <https://doi.org/10.1111/jnc.15796>.
59. Cope TE, Rittman T, Borchert RJ, Jones PS, Vatansever D, Allinson K, et al. Tau burden and the functional connectome in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain*. 2018;141(2):550–67. <https://doi.org/10.1093/brain/awx347>.
60. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Tanaka N, Kakuta Y, et al. Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(9):911–8.
61. Irwin DJ, Bretschneider J, McMillan CT, Cooper F, Olm C, Arnold SE, et al. Deep clinical and neuropathological phenotyping of Pick disease. *Ann Neurol*. 2016;79(2):272–87. <https://doi.org/10.1002/ana.24559>.
62. Leroux E, Perbet R, Caillierez R, Richetin K, Lieger S, Espourteille J, et al. Extracellular vesicles: major actors of heterogeneity in tau spreading among human tauopathies. *Mol Ther*. 2022;30(2):782–97. <https://doi.org/10.1016/j.jmthe.2021.09.020>.
63. Hansson K, Dahlen R, Hansson O, Pernevik E, Paterson R, Schott JM, et al. Use of the tau protein-to-peptide ratio in CSF to improve diagnostic classification of Alzheimer's disease. *Clin Mass Spectrom*. 2019;14 Pt B:74–82. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2019.07.002>.
64. Sotiropoulos I, Galas MC, Silva JM, Skoulakis E, Wegmann S, Maina MB, et al. Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):91. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0489-6>.
65. Okun E, Mattson MP, Arumugam TV. Involvement of Fc receptors in disorders of the central nervous system. *Neuromolecular Med*. 2010;12(2):164–78. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8099-5>.
66. Fuller JP, Stavenhagen JB, Teeling JL. New roles for Fc receptors in neurodegeneration—the impact on immunotherapy for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*. 2014;8:235. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00235>.
67. Funk KE, Mirbaha H, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI. Distinct therapeutic mechanisms of Tau antibodies: promoting microglial clearance versus blocking neuronal uptake. *J Biol Chem*. 2015;290(35):21652–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657924>.
68. Andersson CR, Falsig J, Stavenhagen JB, Christensen S, Kartberg F, Rosenqvist N, et al. Antibody-mediated clearance of tau in primary mouse microglial cultures requires Fcγ-receptor binding and functional lysosomes. *Sci Rep*. 2019;9(1):4658. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41105-4>.
69. Mac Donald CL, Dikranian K, Bayly P, Holtzman D, Brody D. Diffusion tensor imaging reliably detects experimental traumatic axonal injury and indicates approximate time of injury. *J Neurosci*. 2007;27(44):11869–76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3647-07.2007>.
70. Holmes HE, Colgan N, Ismail O, Ma D, Powell NM, O'Callaghan JM, et al. Imaging the accumulation and suppression of tau pathology using multiparametric MRI. *Neurobiol Aging*. 2016;39:184–94. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.12.001>.
71. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):59–65. <https://doi.org/10.1038/nbt.1515>.
72. Fu H, Dirosario J, Killedar S, Zarsaspe K, McCarty DM. Correction of neurological disease of mucopolysaccharidosis IIIB in adult mice by rAAV9 trans-blood-brain barrier gene delivery. *Mol Ther*. 2011;19(6):1025–33. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.34>.
73. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Guerrero-Munoz MJ, Kiritoshi T, Neugebauer V, et al. Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci Rep*. 2012;2:700. <https://doi.org/10.1038/srep00700>.
74. Ghag G, Bhatt N, Cantu DV, Guerrero-Munoz MJ, Ellsworth A, Sengupta U, et al. Soluble tau aggregates, not large fibrils, are the toxic species that display seeding and cross-seeding behavior. *Protein Sci*. 2018;27(11):1901–9. <https://doi.org/10.1002/pro.3499>.
75. Devous MD Sr, Fleisher AS, Pontecorvo MJ, Lu M, Siderowf A, Navitsky M, et al. Relationships between cognition and neuropathological Tau in Alzheimer's disease assessed by 18F Flortaucipir PET. *J Alzheimers Dis*. 2021;80(3):1091–104. <https://doi.org/10.3233/JAD-200808>.
76. Moreira GG, Cantrelle FX, Quezada A, Carvalho FS, Cristovao JS, Sengupta U, et al. Dynamic interactions and Ca(2+)-binding modulate the holdase-type chaperone activity of S100B preventing tau aggregation and seeding. *Nat Commun*. 2021;12(1):6292. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26584-2>.
77. Mok SA, Condello C, Freilich R, Gillies A, Arhar T, Oroz J, et al. Mapping interactions with the chaperone network reveals factors that protect against tau aggregation. *Nat Struct Mol Biol*. 2018;25(5):384–93. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0057-1>.
78. Danis C, Dupre E, Bouillet T, Denechaud M, Lefebvre C, Nguyen M, et al. Inhibition of tau neuronal internalization using anti-tau single domain antibodies. *Nat Commun*. 2025;16(1):3162. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-58383-4>.
79. Mortelet J, Zejnli O, Begard S, Simoes MC, Elhajj L, Nguyen M, et al. A selection and optimization strategy for single-domain antibodies targeting the PHF6 linear peptide within the tau intrinsically disordered protein. *J Biol Chem*. 2024;300(4): 107163. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107163>.
80. Caillierez R, Begard S, Lecolle K, Deramecourt V, Zommer N, Dujardin S, et al. Lentiviral Delivery of the Human Wild-type Tau Protein Mediates a Slow and Progressive Neurodegenerative Tau Pathology in the Rat Brain. *Mol Ther*. 2013;21(7):1358–68. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.66>.
81. Tucker KL, Meyer M, Barde YA. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci*. 2001;4(1):29–37. <https://doi.org/10.1038/82868>.
82. Dujardin S, Begard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, et al. Ectosomes: a new mechanism for non-exosomal secretion of tau protein. *PLoS One*. 2014;9(6):e100760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100760>.
83. Perbet R, Zufferey V, Leroux E, Parietti E, Espourteille J, Culebras L, et al. Tau Transfer via Extracellular Vesicles Disturbs the Astrocytic Mitochondrial System. *Cells*. 2023;12(7). <https://doi.org/10.3390/cells12070985>.
84. McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, et al. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem*. 2005;280(17):16925–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412882200>.

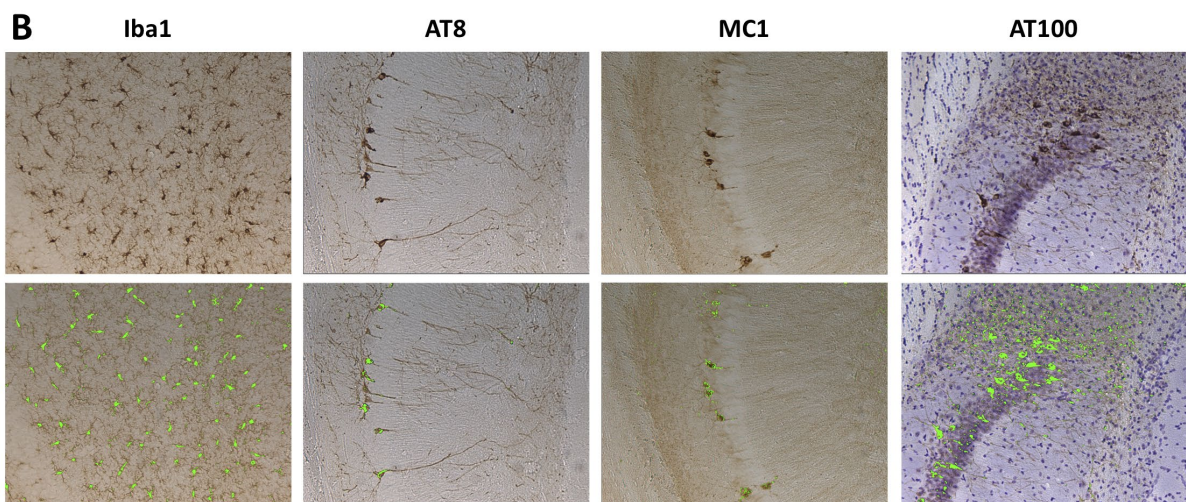
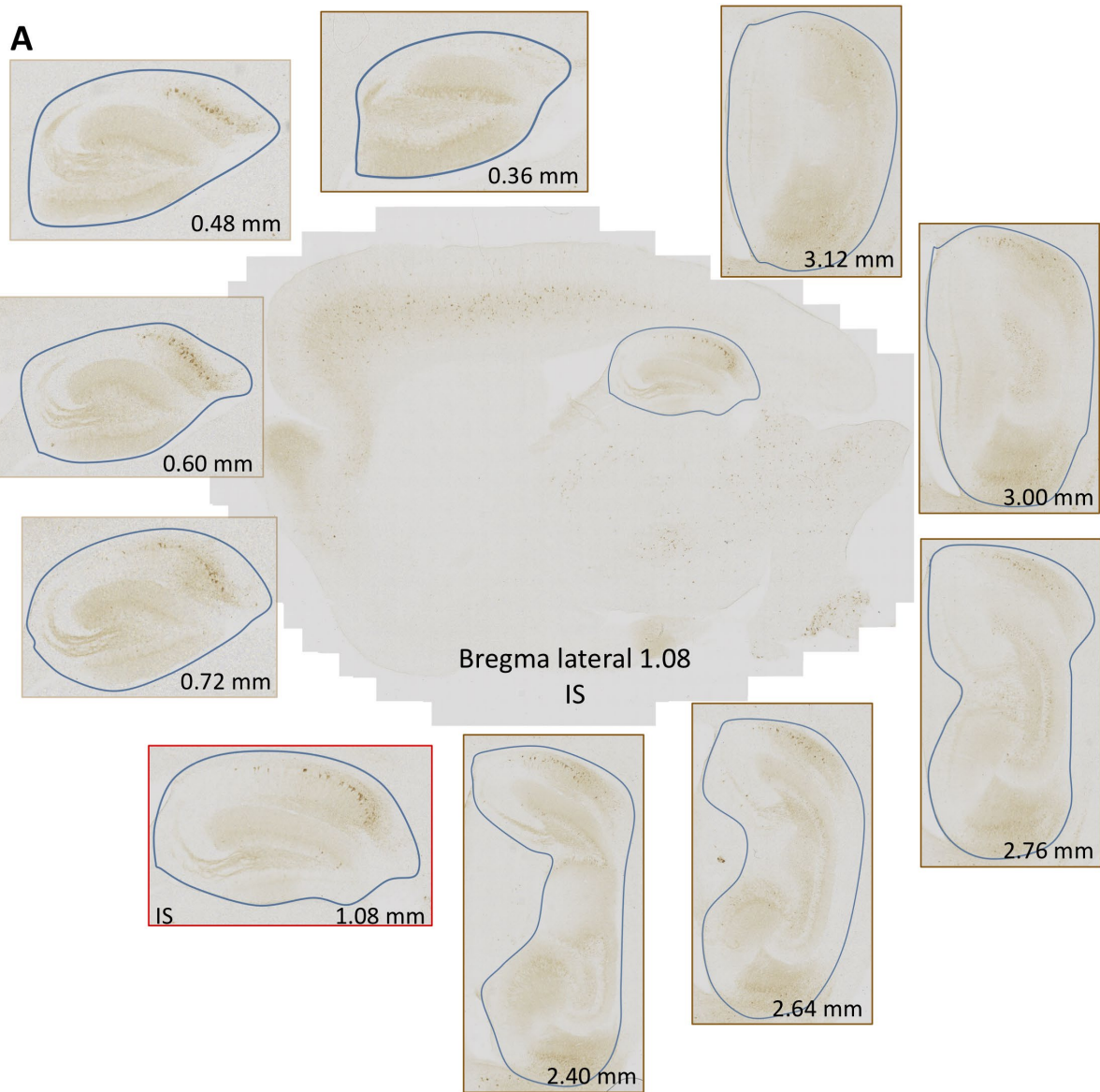
Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

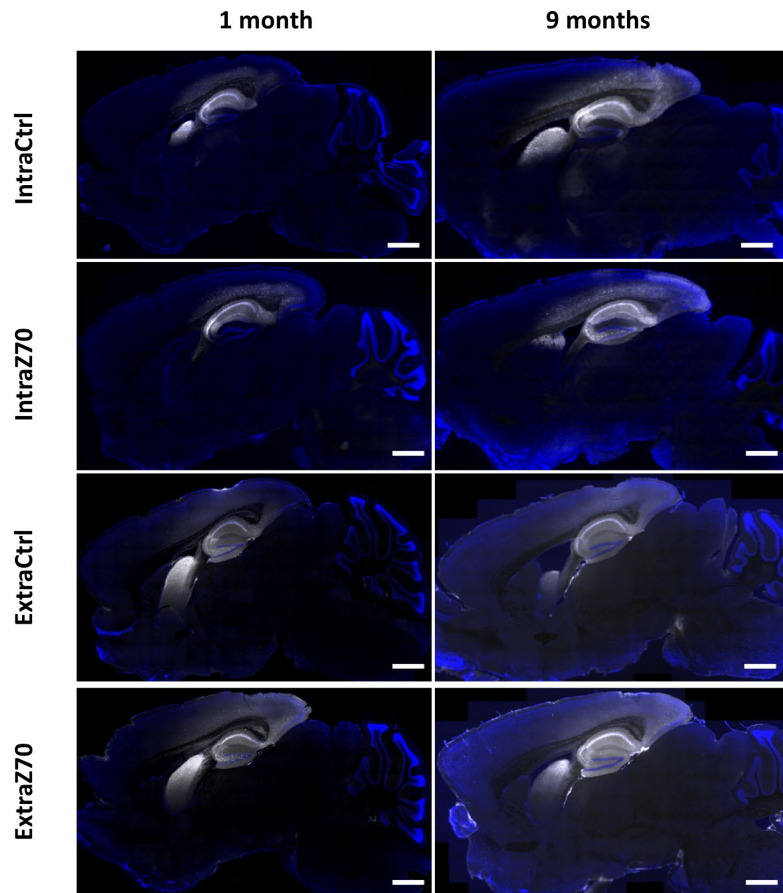
Supplementary figures



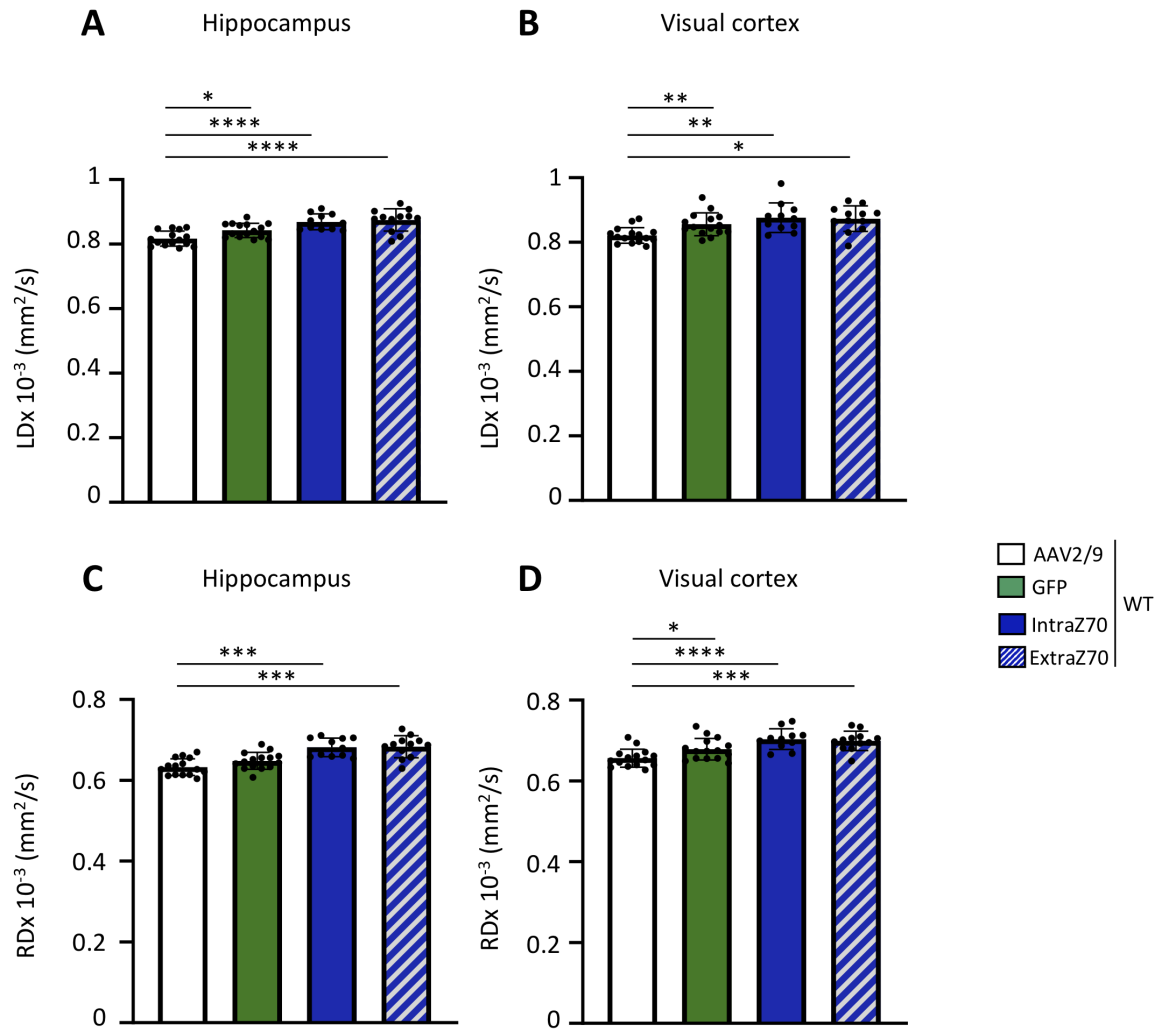
Supplementary figure 1: Selection of AAVs - (A) AAVs (2/7, 2/8, 2/9 and 2/10) encoding GFP under the control of a CMV promoter. **(B)** Immunodetection of GFP (white) and nuclei (blue) one month after hippocampal (HIPPO) or intracerebroventricular (ICV) injection are shown on sagittal sections. H=hippocampus, ViC=visual cortex. Scale bars=1000 μ m. **(C)** Quantification of GFP expression was done using ImageJ. **(D)** Immunodetection of GFP (white) and nuclei (blue) are shown in the spinal cord for AAV2/7, AAV2/9 and AAV2/10. **(E)** Immunodetection of GFP (AAV2/9) (left part) and AT8 (right part) in the cervical, thoracic and dorsal parts of the spinal cord. Scale bars are indicated on the figure. For B and D, a slide scanner was used to visualize the whole sagittal sections. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$.



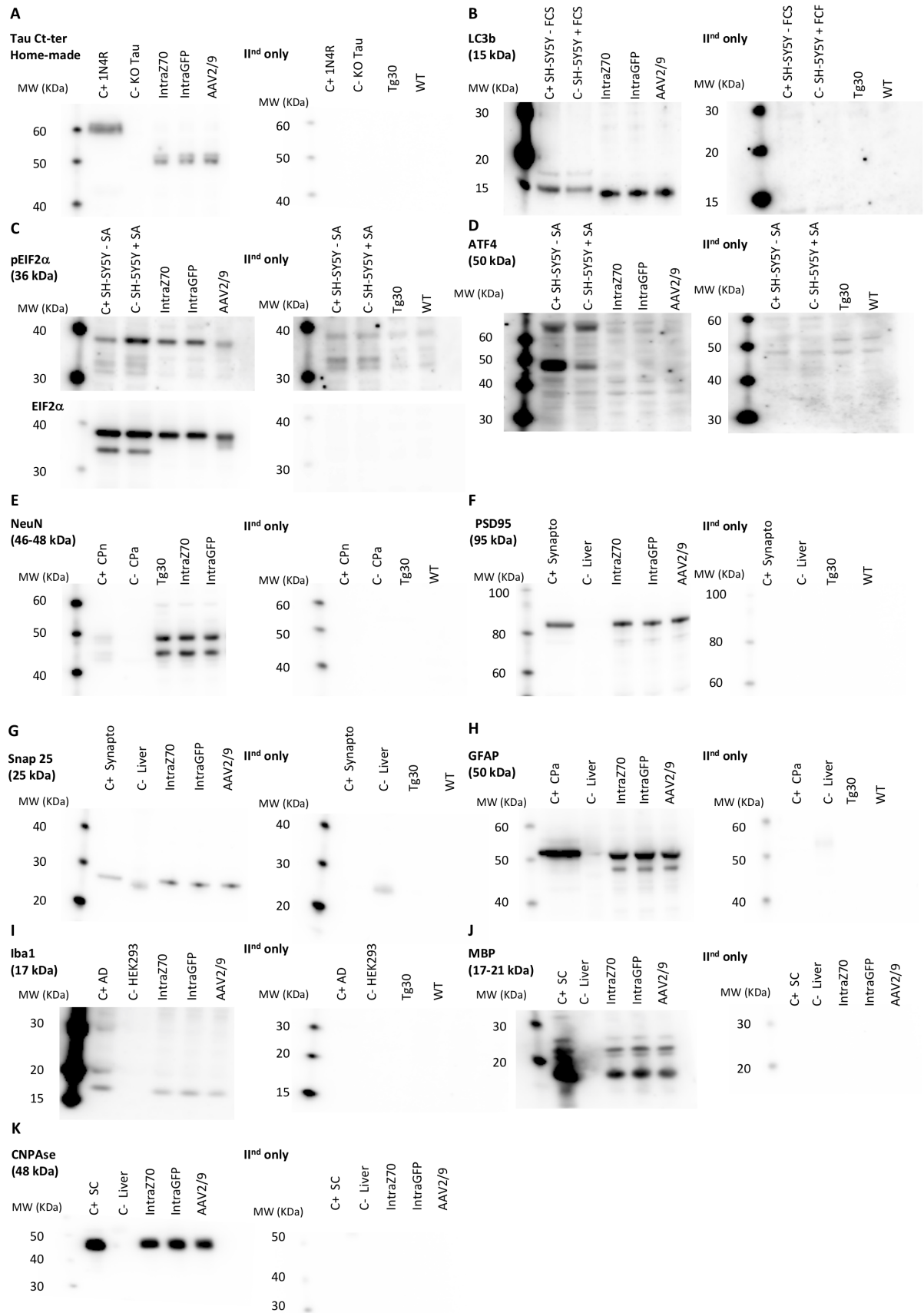
Supplementary figure 2: Set-up for the quantification of tau lesions- **(A)** For blinded quantification of Iba1, AT8, MC1 and AT100 immunoreactivities, the hippocampus from lateral bregma 0.36 to lateral bregma 3.12 (based on the Mouse Atlas, George Paxinos and Keith B.J. Franklin, Second Edition, Academic Press) was chosen as the quantification zone from sagittal brain sections. The injection site (IS) is shown at the center and the other bregmas are shown in periphery. Quantified areas are delimited in blue. **(B)** A specific threshold was applied as shown in green (lower panel) for quantification using the Mercator software.



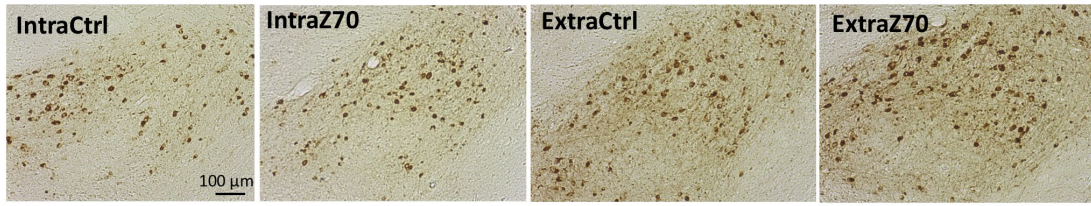
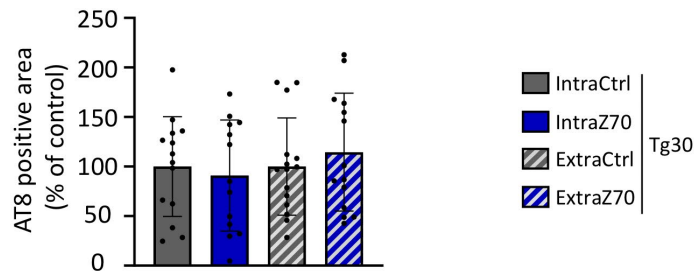
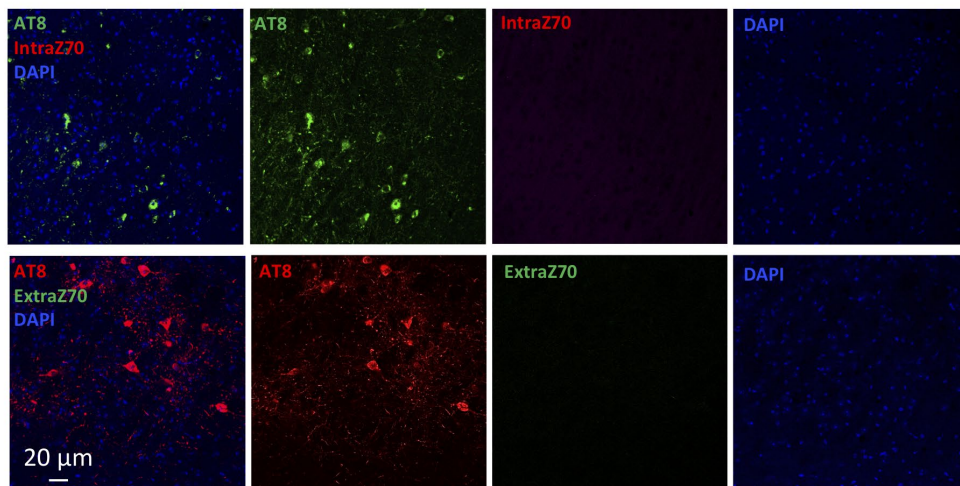
Supplementary figure 3: VHH expression- VHHs were injected in the hippocampus of Tg30 and the animals were sacrificed 1 or 9 months later. VHH immunodetection is shown on sagittal sections. Intra- and extraVHH are visualized in white and nuclei in blue. Scale bars=1000 μ m.



Supplementary figure 4: VHH Safety: 8 months post-injection of WT mice, MRI scans were used to determine DTI signals: LD (**A**, **B**), RD (**C**, **D**) in the hippocampus and in the visual cortex. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ****: $p < 0.0001$.



Supplementary figure 5: Antibody validation for the biochemical safety assay - Proteins were detected by SDS-PAGE using primary antibodies against TauCter (A), LC3b (B), pEIF2 α and EIF2 α (C), ATF4 (D), NeuN (E), PSD95 (F), Snap25 (G), GFAP (H) or Iba1 (I) and detected with the appropriate secondary antibody (left panels) or secondary antibody alone (right panels). Antibody information is provided in Table 1. Positive (C+) and negative (C-) controls were used to validate the antibodies and two to three samples coming from the chronic model are shown to illustrate the quantification of Figure 4. 1N4R (HEK cell line overexpressing the 1N4R tau isoform) [80], KOTau (brain lysate of a tau knock-out mouse) [81], FCS (fetal calf serum), CPn (cortical primary neurons) [82], CPa (primary astrocytes) [83], SA (sodium arsenate) [84], Synapto (synaptosome fraction), Liver (mice liver lysate), AD (human brain lysate, Braak 6, frontal cortex).

A**B****C**

Supplementary figure 6: Tau pathology in aged Tg30, a chronic model of tau pathology expressing intraZ70 or extraZ70- (A) Representative images of mice with AT8 immunostaining in the amygdala. Scale bar is indicated in the figure. (B). AT8 immunoreactivity in the amygdala were blindly quantified using the Mercator software. Results are expressed as the percentage of AT8-positive area relative to control. (C) Immunohistofluorescence were done

in the amygdala to reveal phosphoTau (AT8 in green or red) and intraZ70 (red) or extraZ70 (green), nuclei are visualized in blue. Mean intensity projections are shown. Scale bar is indicated on the figure.

RESUME

Les tauopathies sont un groupe de maladies neurodégénératives hétérogènes ayant pour caractéristique commune une accumulation intracellulaire d'agrégats composés de protéine tau. Dans la maladie d'Alzheimer, la pathologie tau évolue selon une progression stéréotypée, connue sous le nom de stade de Braak. Aujourd'hui ces stades sont considérés comme les étapes d'une propagation de la neurodégénérescence de « type prion » et orientent vers une nouvelle cible potentielle, la protéine tau dans le liquide interstitiel (extraTau). Dans d'autres tauopathies, comme la paralysie supranucléaire progressive, ce type de propagation semble moins évident et cibler la protéine tau à l'intérieur des cellules (intraTau) semble primordial.

Des traitements ciblant la protéine tau, en particulier des immunothérapies, ont été développés et l'injection périphérique d'anticorps monoclonaux anti-tau est déjà en cours d'essais cliniques. Malheureusement, ceux-ci pénètrent mal dans le cerveau, ont des difficultés à parvenir à leur cible dans le liquide interstitiel autour des cellules et n'atteignent pas les protéines intraneuronales. Dans ce contexte, l'ingénierie des anticorps représente une approche alternative pour cibler la protéine tau. Les VHHs sont des fragments d'anticorps de camélidés présentant de nombreux avantages, ils peuvent notamment être exprimés au sein des cellules ou être sécrétés dans le compartiment extracellulaire.

Notre groupe a développé le VHH Z70 ciblant une séquence de la protéine tau connue pour son rôle majeur dans la formation des agrégats, l'hexapeptide $_{306}\text{VQIVYK}_{311}$ nommé PHF6. Ce projet de thèse, réalisé à la fois dans des modèles murins aigus mais également chroniques, nous a permis d'évaluer la capacité de ce VHH à réduire la pathologie tau en agissant directement dans les cellules (intraZ70) ou en ciblant la protéine tau dans le liquide interstitiel (extraTau). Cette étude pose également la question des effets indésirables d'une expression à long terme des VHHs anti-tau. En effet, le PHF6 n'est pas un épitope spécifique de la protéine tau pathologique et est présent sur la protéine tau endogène. Nous avons ainsi contrôlé que les VHHs Z70 n'affectent pas le fonctionnement du cerveau.

Ce travail de thèse a permis de démontrer l'efficacité des VHHs Z70 dans la prévention des déficits cognitifs ou de l'atrophie cérébrale et dans la réduction de l'hyperphosphorylation neuronale de la protéine tau. L'innocuité de l'approche a été confirmée par de multiples indicateurs. Cette étude valide ainsi la faisabilité de réduire directement la pathologie tau dans les cellules ou d'en limiter sa propagation. La comparaison des approches de ciblage intraTau et extraTau a également permis une meilleure compréhension mécanistique de leurs activités et présente un intérêt général pour le développement de biothérapies anti-tau.

Mots clés : Protéine tau, tauopathies, immunothérapie, VHH