HAL
open science

Approche d'immunothérapie dans un modèle murin de pathologie Tau

Laetitia Troquier Troquier-Péricou

To cite this version:

Laetitia Troquier Troquier-Péricou. Approche d'immunothérapie dans un modèle murin de pathologie Tau. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S021 . tel-01138133

HAL Id: tel-01138133

https://theses.hal.science/tel-01138133

Submitted on 1 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ LILLE - NORD DE FRANCE
UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2

École Doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2
Spécialité : neurosciences

Présentée par

Laetitia TROQUIER-PERICOU

APPROCHE D'IMMUNOTHERAPIE DANS UN MODELE MURIN DE PATHOLOGIE TAU

Soutenue publiquement le 17 Octobre 2011 devant le Jury composé de :

Mme le Pr. Nicole DEGLON Rapporteur
M. le Pr. Pierre AUCOUTURIER Rapporteur
M. le Dr. Stéphane HUNOT Examinateur
M. le Dr. Philippe LASSALLE Président du Jury
M. le Dr. David BLUM Examinateur
M. le Dr. Luc BUÉE Directeur de thèse

A mon binôme,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres de mon jury, le **Pr. Nicole Déglon**, le **Pr. Pierre Aucouturier**, le **Dr. Stéphane Hunot**, le **Dr. Philippe Lassalle**, le **Dr. David Blum** et le **Dr. Luc Buée** pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner ce travail. Je remercie en particulier le **Pr. Nicole Déglon** et le **Pr. Pierre Aucouturier** pour avoir accepté de lire avec minutie mon manuscrit de thèse et d'évaluer la qualité du travail effectué durant ces trois années de doctorat.

Je remercie le **Pr. Pierre Formstecher** pour m'avoir hébergée au sein du centre de recherche Jean-Pierre Aubert et de l'Unité Inserm 837.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au **Dr. Luc Buée** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche « Alzheimer & Tauopathies » durant ces trois années. Malgré vos nombreuses responsabilités, vous avez toujours su être là même quand vous étiez à l'autre bout du monde ! J'ai pris un réel plaisir à effectuer cette thèse sous votre direction. Comme tout thésard j'ai eu des moments de doute, ma tendance à voir « le verre à moitié vide » n'a rien arrangé mais vous avez toujours su me montrer le côté positif des choses. Avec le recul, je me rends compte que tous ces petits nuages ont été très formateurs et pour ça je vous remercie. Au delà de vos compétences scientifiques, j'ai énormément apprécié votre bonne humeur, votre sympathie et votre humour. Je garde également de très bons souvenirs de vos chorégraphies. Merci pour tout.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au **Dr. David Blum,** le roi de « la vache qui rit ». Merci David d'avoir pris le temps, entre deux taquineries sur mes cheveux, de t'intéresser à ce travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié tes remarques pertinentes, tes conseils et ta disponibilité.

Je tiens à remercier le **Dr. Philippe Lassalle** ainsi que **Gwenola Kervoaze** pour leur précieuse aide dans la génération et la purification des anticorps monoclonaux.

Je tiens à remercier le **Dr. Malika Hamdane** et le **Dr. Nicolas Sergeant** pour leurs conseils avisés, leurs idées pertinentes et leur sympathie.

Merci également aux Docteurs **Valérie Buée-Scherrer**, **Marie-Laure Caillet-Boudin, Morvane Colin**, **Claire-Marie Dhaenens**, **Marie-Christine Galas**, **Sandrine Humez**, **Bernard Sablonnière** et **Susanna Schraen** pour leur soutien et leurs remarques constructives lors des réunions de laboratoire.

Raphaëlle, notre première rencontre fût un véritable soulagement pour moi : non je n'allais pas manger en tête à tête avec David et Luc ! La bourse de thèse en poche j'arrivai pour de bon au laboratoire. Tu m'as accueillie, tu m'as tout appris et puis j'ai pris mon envol : je pouvais désormais injecter seule les souris des autres…Merci pour le temps que nous avons passé ensemble au laboratoire et en dehors. J'espère vraiment que nous garderons contact par la suite et je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie dans ta nouvelle maison.

Je tiens également à remercier les autres « dictatrices »**, Séverine, Sabiha, Sophie, Nadège** grâce à qui je suis passée au rang 6. Merci pour vos coups de gueule, c'était tellement drôle enfin pour nous… j'ai une pensée pour tous ceux qui ont du nettoyer la sorbonne au moins

une fois…

Alors merci à l'équipe des garçons **Antoine, Cyril, Francisco, Maxime** pour avoir su nous faire rire, bien souvent malgré vous. Merci à **Antoine** pour son soutien capillaire. Merci à mon voisin de bureau **Maxime**, je pense qu'on peut avoir une belle carrière dans le grand banditisme… Merci pour toutes vos expériences et vos discussions enrichissantes. J'ai beaucoup apprécié d'envahir les boites mail des autres avec vous et de perfectionner ma maîtrise de Photoshop avec l'aimable participation de **Francisco.** Merci à **Cyril** mon prof particulier d'immunologie, toi seul à su déceler mon talent…

Je tiens également à remercier ceux qui sont déjà parti mais dont j'ai eu la chance de croiser la route : **Audrey, Hélène, Karim, Marie Eve et Sylvie**. **Audrey**, j'ai beaucoup apprécié nos cours improvisés d'anglais, ils ont eu le mérite de nous redonner confiance ! **Karim**, je n'ai pas vraiment eu l'occasion de travailler avec toi mais j'ai vraiment apprécié tes qualités en dehors du labo. D'ailleurs, mon canapé se souviendra longtemps de toi ! **Marie Eve,** la force calme du labo.. Ca a été un réel plaisir de travailler avec toi. **Sylvie** et **Hélène,** les deux acolytes, vous avez été un précieux soutien tout au long de cette thèse et particulièrement pendant la rédaction. **Sylvie** attention 20 articles envoyés en 5 min **ça** ressemble beaucoup à David… En dehors de vos qualités indéniables de scientifiques, vous êtes juste des filles terribles !! J'espère vraiment que nous aurons l'occasion de nous revoir par la suite.

Merci aux copines de bureau **Claire, Katia, Nadège et Sophie** pour votre bonne humeur. J'ai réellement apprécié de parfaire mon côté artiste avec vous, même si mon talent n'est pas à la hauteur du Némo de Claire… et merci pour ces vraies crises de rire qui font pleurer.

Je tiens également à remercier **Maurice** pour ces semaines de rêve au bord de l'eau…

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire et du centre qui rendent ou ont rendu notre cadre de travail agréable et sympathique : **Amélie, Bérangère**, **Céline Brand**, **Céline Carpentier**, **Delphine Taillieu**, **Dominique, Elodie, Fanny**, **Hélène Le Freche**, **Hélène Obriot**, **Ingrid, Jonathan, Julien, Karim, Lucie, Marie Violet, Marie-Jeanne, Michèle, Patrick, Sébastien et Sophie Lesage**. Je vous souhaite à tous une excellente continuation !

RESUME

Dans la maladie d'Alzheimer comme dans un certain nombre de maladies, regroupées sous le terme de Tauopathies, la protéine Tau s'agrège à l'intérieur des cellules, neurones ou cellules gliales. Dans la maladie d'Alzheimer, l'apparition de ces agrégats, constitués de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées, est particulièrement corrélée aux déficits cognitifs observés. A ce jour, plusieurs stratégies thérapeutiques sont étudiées pour traiter la pathologie Tau parmi lesquelles l'immunothérapie. Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif d'étudier les effets de l'immunothérapie Tau, active et passive, dans un modèle transgénique de pathologie Tau de type Alzheimer. Les souris THY-Tau22, surexpriment une isoforme de Tau humaine mutée sur deux sites et sous contrôle d'un promoteur neuronal. Ce modèle présente dès l'âge de trois mois des altérations progressives de l'apprentissage et de la mémoire associée à une accumulation de protéine Tau principalement au niveau hippocampique, sans perte neuronale majeure, ce qui lui confère les caractéristiques d'un stade précoce de MA. Au sein du modèle THY-Tau22, on retrouve la protéine Tau phosphorylée en Ser422, un épitope particulièrement pertinent pour l'immunothérapie. En effet, la pSer422 est un épitope de phosphorylation anormale unique, présent dans la plupart des Tauopathies. Dans ces travaux de thèse, nous montrons que la vaccination précoce contre la Ser422 phosphorylée de la protéine Tau peut prévenir l'altération de mémoire spatiale mesurée par le test du labyrinthe en Y. Cette diminution de l'atteinte cognitive est associée à une diminution de la phosphorylation anormale de Tau au niveau de l'hippocampe et à une réduction significative des espèces insolubles de Tau. Les résultats de cette vaccination nous ont amené à générer un anticorps monoclonal dirigé contre la pSer422 (2H9) afin d'évaluer les effets de l'immunothérapie passive. Selon la même cinétique d'âge, nous avons injecté, chaque semaine, par voie intrapéritonéale, des souris THY-Tau22 avec 5mg/kg et 10mg/kg de 2H9 ou une solution saline. Cette approche prévient l'apparition de déficits de mémoire spatiale mesurée par les tests du labyrinthe en Y et de la piscine de Morris à l'âge de 9 mois. Les analyses immunohistochimiques révèlent également une réduction des protéines Tau anormalement phosphorylées au niveau de l'hippocampe. Afin d'étudier les mécanismes sous jacents à l'immunothérapie anti Tau, nous avons injecté des anticorps anti-phosphoTau par stéréotaxie au niveau de l'hippocampe de souris THY-Tau22. Nous montrons, qu'une fois au sein du cerveau, ils sont capables d'entrer dans les neurones contrairement au contrôle isotypique. Plusieurs études récentes d'immunothérapie, suggèrent une implication de la voie lysosomiale dans la dégradation médiée par les anticorps. Nous montrons que les anticorps internalises dans les neurones colocalisent avec différents marqueurs de la voie lysosomiale (NPC1, Lamp2) confirmant l'hypothèse d'une dégradation par le lysosome. Cependant, la barrière hémato encéphalique étant très sélective, il est fort probable que les anticorps générés restent en périphérie. Nous montrons, que l'administration périphérique de 250μg d'anticorps 2H9 génère une augmentation significative de la protéine Tau au niveau plasmatique suggérant un mécanisme de siphon périphérique comme dans l'immunothérapie Aβ. La vaccination, qui génère une réponse polyclonale, conduit à une augmentation plus importante de la Tau plasmatique qui confirme l'hypothèse d'une dégradation périphérique de la protéine Tau. L'ensemble des résultats de cette thèse confirme le potentiel de l'immunothérapie Tau dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et des autres Tauopathies. Il propose une nouvelle hypothèse quant à la dégradation de la protéine Tau médiée par les anticorps: l'effet siphon périphérique.

ABSTRACT

In Alzheimer's disease as in several diseases, grouped under the term tauopathies, the Tau protein aggregates inside cells, neurons or glial cells. In Alzheimer's disease, the appearance of these aggregates, consisting of Tau protein hyper- and abnormally phosphorylated is particularly correlated with cognitive deficits. To date, several therapeutic approaches are being studied to treat Tau pathology including immunotherapy. The work presented in this thesis aim to investigate the effects of Tau immunotherapy, both active and passive, in a transgenic Alzheimer's disease-like Tau pathology. THY-Tau22 mice, overexpressing a mutant isoform of human Tau at two sites and under neuronal control of a promoter. This model presents progressive impairment of learning and memory in parallel with an accumulation of Tau protein mainly in the hippocampus, without major loss of neurons, giving it the characteristics of a stage early AD. Within the model THY-Tau22, there is the Tau protein phosphorylated at Ser422, within a particular relevant epitope for immunotherapy. Indeed, the pSer422 epitope is a single abnormal site of phosphorylation which is present in several Tauopathies. In the thesis work, we show that early vaccination against the phosphorylated Ser422 Tau protein can prevent the impairment of spatial memory as measured by the Y-maze test. This decrease in cognitive impairment is associated with a decrease in the abnormal phosphorylation of Tau in the hippocampus and a significant reduction in insoluble Tau species. The results of this vaccination have led us to generate a monoclonal antibody directed against pSer422 (2H9) to evaluate the effects of passive immunotherapy. According to the same kinetic, we injected each week, intraperitoneally, THY-Tau22 mice with 5mg/kg and 10mg/kg of 2H9 or saline buffer. This approach prevents the appearance of deficits in spatial memory tests as measured by the Y maze and the Morris water maze at the age of 9 months. Immunohistochemical analysis also revealed a reduction of abnormally phosphorylated Tau proteins in the hippocampus. To investigate the mechanisms underlying Tau immunotherapy, we injected anti-phosphoTau by stereotaxic in the hippocampus of THY-Tau22 mice. We show that, once in the brain, they are able to enter neurons in contrast to the isotype control. Several recent studies of immunotherapy, suggest an involvement of lysosomal pathway in the antibody-mediated degradation. We show that internalized antibodies colocalize with different markers of lysosomal pathway (NPC1, Lamp2) confirming the hypothesis of a degradation by the lysosomal pathway. However, the blood-brain barrier is highly selective, it is likely that the antibodies act in the periphery. We show that peripheral administration of 250µg antibody 2H9 generates a significant increase in Tau protein in plasma suggesting a peripheral sink mechanism as in Aβ immunotherapy. Vaccination, which generates a polyconal response, leads to a greater increase of plasmatic Tau that confirms the peripheral degradation of Tau. The overall results of this thesis confirms the potential of Tau immunotherapy in the treatment of Alzheimer's disease and other Tauopthies. It offers a new hypothesis regarding the degradation of Tau protein mediated by antibodies: the peripheral sink hypothesis.

SOMMAIRE

INTRODUCTION **1**

I. GENERALITES SUR L'IMMUNOTHERAPIE **1**

1 LE SYSTEME IMMUNITAIRE **1**

1.1 Les organes et tissus lymphoides 1

1.2 Les cellules de l'immunité innée 2

1.2.1. Les phagocytes : neutrophiles et monocytes/macrophages 2

1.2.2. Les cellules NK 2

1.2.3. Le système du complément 2

1.2.4. Les cellules présentatrices de l'antigène 3

1.3 Les cellules de l'immunité adaptative 3

1.3.1. Les lymphocytes B 4

1.3.2. Les lymphocytes T 4

1.4 Les molécules de l'immunité 4

1.4.1. Les molécules du CMH 4

1.4.2. Les cytokines 5

1.4.3. Les anticorps 5

1.4.3.1 Structure 5

1.4.3.2 Les différents isotypes 6

1.4.3.3 Les fonctions effectrices des anticorps 7

2. L'IMMUNOTHERAPIE **8**

2.1 Un peu d'histoire 9

2.2 Principe de la vaccination 9

2.2.1. Les différents vaccins 10

2.2.2. Les différents adjuvants 11

2.3 Immunothérapie passive et immunothérapie adoptive 12

II. IMMUNOTHERAPIE ET PROTEINOPATHIES NEURODEGENERATIVES **13**

1. DES AGREGATS PROTEIQUES EXTRANEURONAUX **13**

1.1 La maladie d'Alzheimer 13

1.1.1. Généralités 13

1.1.1.1 Clinique 13

1.1.1.2 Lésions neuropathologiques 14

a. Dépôts amyloïdes 14

b. Dégénérescence neurofibrillaire 15

1.1.1.3 Etiologie 15
1.1.2. Immunothérapie Active 17
1.1.2.1 Etudes précliniques (1999 à 2001) 17
1.1.2.2 Etudes cliniques (2000 à 2002) 17
1.1.2.3 La deuxième génération de vaccin anti-Aβ 18
a. Séquence épitopique du peptide Aβ 18
b. Adjuvants 19
c. Mode d'administration 19
1.1.3. Immunothérapie Passive 20
1.1.3.1 Etudes précliniques 20
1.1.3.2 Etudes cliniques 21
1.1.4. Les mécanismes d'action potentiels de l'immunothérapie contre le peptide Aβ 23
1.2 Les maladies à Prions 25
1.2.1 Généralités 25
1.2.2 Immunothérapie active 27
1.2.3 Immunothérapie passive 27
1.2.4 Immunothérapie adoptive 28
1.2.5 Les mécanismes d'action potentiels de l'immunothérapie contre le prion 29
2. ... AUX AGREGATS PROTEIQUES INTRANEURONAUX 30
2.1 La maladie de Parkinson 30
2.1.1. Généralités 30
2.1.2. Immunothérapie active 31
2.1.3. Immunothérapie passive 32
2.1.4. Immunothérapie adoptive 33
2.2 La Maladie de Huntington 34
2.2.1. Généralités 34
2.2.2. Immunothérapie 34
III. TAU ET TAUOPATHIES 37
1. LA PROTEINE TAU 37
1.1 Gène et epissage alternatif 37
1.2 Structure et modifications post traductionnelles 38
1.2.1 Structure de la protéine Tau 38
1.2.2 Phosphorylation 39
1.2.2.1 La phosphorylation par les kinases 39
1.2.2.2 La déphosphorylation par les phosphatases 39
1.2.2.3 Les autres acteurs de la phosphorylation 40
1.2.3 Autres modifications 40
1.3 Localisations et fonctions de la proteine Tau 40

1.3.1 Tau cytoplasmique 41
1.3.1.1 Tau et dynamique microtubulaire 41
1.3.1.2 Tau et transport axonal 42
1.3.1.3 Tau et polarité neuronale 42
1.3.2 Tau associée à la membrane 42
1.3.3 Tau nucléaire 43
2. LES TAUOPATHIES 43
2.1 Concept des Tauopathies 43
2.2 Propagation 47
2.3 L'agrégation de la protéine Tau 48
2.3.1. Les mutations 48
2.3.2. La phosphorylation 49
2.3.3. Troncation 51
2.3.4. Autres modifications post traductionnelles 52
2.4 Les oligomères 52
2.5 Stratégies thérapeutiques 53
2.5.1. Inhibition de l'hyperphosphorylation 53
2.5.2. Inhibition de l'agrégation 54
2.5.3. Stabilisation des microtubules 54
2.5.4. Augmenter la dégradation et la clairance de Tau 55
2.5.5. Modification de l'épissage 56
2.5.6. Immunothérapie 56
OBJECTIFS 60
RESULTATS 64
I. VACCINATION CONTRE LA PROTEINE TAU PS422 DANS LE MODELE THY-TAU22 64
1. OBJECTIFS 64
2. RESULTATS 65
3. CONCLUSION 88
II. IMMUNOTHERAPIE PASSIVE TAU PS422 DANS LE MODELE THY-TAU22 ET MECANISMES SOUS JACENTS 89
1. OBJECTIFS 89
2. RESULTATS 89
3. CONCLUSIONS 109
DISCUSSION 110
BIBLIOGRAPHIE 121

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Schéma des principaux organes de notre système immunitaire. 2
Figure 2. Structure d'un anticorps 5
Figure 3. Différentes fonctions effectrices des IgG. 8
Figure 4. Résumé simplifié des réactions immunitaires en réponse à l'introduction d'un antigène peptidique. 10
Figure 5. Mode d'action des adjuvants. 12
Figure 6. Aspect histologique des dépôts amyloïdes extracellulaires 14
Figure 7. Métabolisme de l'APP. 14
Figure 8. Principales hypothèses du mode d'action de l'immunothérapie Aβ 24
Figure 9. Aspect histologique des dépôts de protéine prion. 26
Figure 10. Aspects histologiques du corps de Lewy 30
Figure 11. Mécanisme hypothètique de la dégradation de l'α-synucléine par les anticorps.... 32
Figure 12. Aspect histologique des inclusions intraneuronales de Huntingtine 34
Figure 13. Représentation schématique du transcrit primaire de *tau* et des six isoformes du SNC adulte humain 38
Figure 14. Structure de Tau. 38
Figure 15. Phosphorylation de la protéine Tau et dynamique microtubulaire 41
Figure 16. Différentes structures des agrégats de Tau. 44
Figure 17. Classification des Tauopathies 45
Figure 18. Distribution de la pathologie Tau au cours de la MA. 46
Figure 19. Schéma hypothétique de la progression de la pathologie Tau dans la MA. 47
Figure 20. Phosphorylation pathologique de la protéine Tau 50
Figure 21. Progression de la pathologie Tau au cours de l'âge au sein de l'hippocampe de souris THY-Tau22 60
Figure 22. Absence de perte neuronale majeure dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 . 61
Figure 23. Les barrières du cerveau 115
Figure 24. Action des anticorps sur les mécanismes de propagation de la protéine Tau 118

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des principaux isotypes d'anticorps 7
Tableau 2. Essais cliniques d'immunothérapies actives anti-Aβ 20
Tableau 3. Essais cliniques d'immunothérapies passives anti-Aβ 23
Tableau 4. Les essais de vaccination Tau. 57
Tableau 5. Les études d'immunothérapie passive en développement. 59

ABREVIATIONS

AAV	Adeno-associated virus
Aβ	Amyloïde beta
Ac	Anticorps
ACF/AIF	Adjuvant Complet/Incomplet de Freund
ADCT	Antibody-dependent cellular toxicity
APP	Amyloid precursor protein
Ag	Antigène
BCG	Bacille de Calmette de Guérin
BCR	B Cell Receptor
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
BSA	Bovine Serum Albumin
CA	Corne d'Ammon
CD	Cluster Differenciation
Cdk	Cyclin Dependent kinase
CDR	Complementary Determining Region
CK	Cytokines
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène
DCB	Démence Cortico Basale
DGA	Démence à Grains Argyrophiles
DFTP-17	Démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire
DM	Dystrophie Myotonique
EGF	Epidermal Growth Factor
EST	Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles
GDNF	Glial Cell line-derived Neurotrophic Factor
FDA	Food and Drug Adminstration
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GSS	syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
Htg	Huntingtine
HLA	Human Leukocyte Antigen
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IFF	Insomnie Fatale Familiale
IFN	Interféron
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
KLH	Keyhole Lympet Hemocyanin
LCR	Liquide Céphalo Rachidien
LB/LT	Lymphocyte B/ Lymphocyte T
LRP	Lipoprotein Receptor-related Protein
LTD	Long Term Depression

LTP	Long Term Potentialisation
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubule Associated Protein
MALT	Mucosae Associated Lymphoid Tissue
MCJ	Maladie de Creutzfeldt-Jakob
MH	Maladie de Huntington
MND	Maladies Neurodégénératives
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine
MT	Microtubules
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural Killer
NT	Neurotrophine
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PHF	Paired helical filaments
PrP	Prion
PrPc	Prion cellulaire
PrPSc	Prion Scrapie
PS (1 ou 2)	Préséniline
PSP	Paralysie Supranucléaire Progressive
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
SAP	Synapse-associated protein
scFv	Single Chain Fragment Variable
SNC	Système Nerveux Central
TCR	T Cell Receptor
T_H	THelper
TNF	Tumor necrosis factor

INTRODUCTION

I. GENERALITES SUR L'IMMUNOTHERAPIE

1 LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Les réponses immunitaires correspondent aux mécanismes de défenses complexes de l'organisme qui discriminent le « soi » du « non-soi » comme les bactéries, les virus, les parasites ou encore les cellules tumorales. L'immunité innée est la première ligne de défense vis-à-vis des agents infectieux et pathogènes qui nous entourent, et ceci chez tous les organismes pluricellulaires. Elle est composée d'un grand nombre de populations cellulaires différentes telles que les monocytes, les macrophages, les cellules Natural Killer (NK), les cellules dendritiques, les leucocytes polynucléaires et des sous populations variées de lymphocytes. La réponse immunitaire adaptative est la seconde ligne de défense contre les agents infectieux et existe uniquement chez les vertébrés. Elle se met en place au bout de 4 jours environ et elle est caractérisée par la participation majeure des lymphocytes (Abbas et Lichtman, Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, 3ème édition).

1.1 LES ORGANES ET TISSUS LYMPHOIDES

Les organes et tissus lymphoïdes correspondent au lieu de résidence des lymphocytes et d'autres cellules du système immunitaire (figure 1).

Les organes lymphoïdes primaires ou centraux sont le siège de la différenciation des lymphocytes T et B (LT et LB) produits à partir de cellules souches hématopoïétiques. Ils correspondent à la moelle osseuse et au thymus.

Les organes lymphoïdes périphériques ou secondaires regroupent les ganglions lymphatiques, la rate et les formations lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT pour « Mucosae Associated Lymphoid Tissue » comprenant les amygdales et les plaques de Peyer). Ce sont des lieux de concentration des lymphocytes, qui facilitent la rencontre des différents acteurs de l'immunité. Il s'agit d'un carrefour entre les circulations sanguines et lymphoïdes.

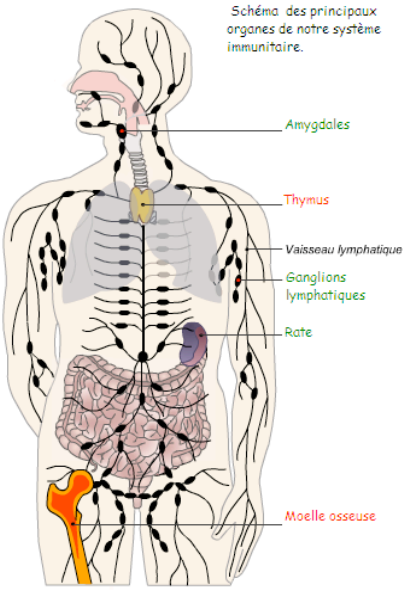


Figure 1. Schéma des principaux organes de notre système immunitaire.

Les organes lymphoïdes primaires sont indiqués en rouge ; il s'agit de la moelle osseuse et du thymus. Ils correspondent aux lieux de formation des cellules du système immunitaire.

Les organes lymphoïdes secondaires (en vert) stoquent sont la rate et ganglions lymphatiques (présents au niveau du cou, des aisselles, de l'abdomen, de l'aine).

1.2 LES CELLULES DE L'IMMUNITE INNEE

1.2.1. Les phagocytes : neutrophiles et monocytes/macrophages

Les phagocytes ou cellules phagocytaires sont les éboueurs de l'organisme, capables de phagocyter et détruire des bactéries et des cellules mortes dans des vésicules intracellulaires. Parmi eux on compte des phagocytes circulants, neutrophiles (également appelés granulocytes, polynucléaires) et monocytes, des cellules sanguines qui sont recrutées au niveau des sites d'infection en réponse aux molécules chimiotactiques.

1.2.2. Les cellules NK

Les cellules tueuses naturelles (NK pour *Natural Killer*) constituent environ 10% des lymphocytes du sang et des organes lymphoïdes périphériques. Elles reconnaissent les cellules infectées ou stressées et répondent en tuant les cellules infectées et en sécrétant de l'interféron (IFN) une cytokine activatrice des macrophages.

1.2.3. Le système du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines circulantes et associées aux membranes qui jouent un rôle important dans les défenses contre les microbes. La cascade du complément peut être activée par 3 voies :

- La voie alterne est mise en jeu par des polysaccharides tels que les endotoxines bactériennes, elle fait partie intégrante de l'immunité innée.
- La voie classique, déclenchée par certains isotypes d'anticorps, est de fait une composante de l'immunité adaptative humorale.
- La voie des lectines est activée lorsque la lectine, une protéine plasmatique se lie aux résidus mannose terminaux des glycoprotéines des microbes.

En réponse à ces diverses activations, les cascades enzymatiques conduisent principalement à l'activation des molécules C5a et C3a (ou anaphylatoxines). Trois grandes fonctions sont attribuables aux produits intermédiaires et finaux de la cascade enzymatique : le recrutement de cellules inflammatoires (monocytes, neutrophiles), l'opsonisation des pathogènes, la lyse des pathogènes par formation de pores.

1.2.4. Les cellules présentatrices de l'antigène

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) représentées principalement par les cellules dendritiques et les macrophages sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Situées dans la peau et les muqueuses, elles capturent les antigènes (Ag) et les dégradent en petites séquences peptidiques, puis les présentent aux lymphocytes T sous une forme très immunogène par des molécules présentes à la surface des cellules : les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). Les CPA ayant capturées un Ag vont quitter la peau ou les muqueuses pour migrer vers les ganglions lymphatiques drainant, où elles viennent en contact avec les lymphocytes et les activent. Les différents types de CPA assurent des fonctions distinctes dans les réponses immunitaires dépendantes des lymphocytes T. Les cellules dendritiques représentent les principaux inducteurs de ces réponses dans la mesure où elles sont les plus efficaces à activer les LT mais influencent également la nature des réponses.

1.3 LES CELLULES DE L'IMMUNITE ADAPTATIVE

Les lymphocytes sont les cellules majeures de la réponse immunitaire adaptative qui font partis des leucocytes.

1.3.1. Les lymphocytes B

La lettre « B » des lymphocytes B ou cellules B provient de la « Bourse de Fabrice » qui est un organe d'oiseaux dans lequel les LB arrivent à maturité. Chez l'Homme, les lymphocytes B arrivent à maturité dans la moelle osseuse. Les LB sont caractérisés par la présence d'un BCR (B Cell Receptor) qui est une immunoglobuline de membrane (Igm). Chaque lymphocyte B ne synthétise qu'une seule variété d'Ig et n'est donc capable de reconnaître qu'un seul épitope. Le lymphocyte B activé se différencie en plasmocytes qui sécrètent activement des anticorps (Ac) dont la structure est proche du BCR. Les LB reconnaissent directement les antigènes dans leur forme native.

1.3.2. Les lymphocytes T

La lettre « T » des lymphocytes T ou cellules T provient du « Thymus », organe humain dans lequel les LT arrivent à maturité. Ils sont caractérisés par la présence d'un TCR (T Cell Receptor), constitués de 2 chaines polypeptidiques associées qui constituent le site de reconnaissance de l'épitope. Contrairement aux LB, les LT reconnaissent uniquement des épitopes séquentiels ou continus associés à des molécules du CMH. L'immunité cellulaire s'exerce par l'intermédiaire de lymphocytes T. On distingue deux populations principales :

- Les LT CD8+ ou LT cytotoxiques qui sont capables de lyser des cellules
- Les LT CD4+ qui donneront notamment des LT auxiliaires ou *Helper* (T_H) qui ont un rôle de régulation de la réponse immunitaire adaptative par activation d'autres cellules immunitaires macrophages, LB, LT cytotoxiques.

1.4 LES MOLECULES DE L'IMMUNITE

1.4.1. Les molécules du CMH

Le Complexe Majeur d'histocompatibilité est une région du génome dont les gènes codent pour les molécules d'histocompatibilité qui sont présentent à la surface de cellules présentatrices d'antigène et qui assurent la présentation des antigènes aux lymphocytes T afin de les activer. On distingue 2 classes de molécules du CMH :

- Le CMH de classe I, présent chez toutes les cellules nucléés, est reconnu par les LT CD8+.Les molécules du CMH I apprêtent les antigènes intracellulaires.

- Le CMH de classe II est exprimé à la surface des CPA dites « professionnelles », les cellules dendritiques, les LB activés et les macrophages. Les molécules du CMH II présentent les peptides généralement extracellulaires aux LT CD4+.

Chez l'homme, le CMH est appelé HLA (pour « *Human Leukocyte Antigen* »).

1.4.2. Les cytokines

Les cytokines (CK) correspondent à des glycoprotéines, comparables aux hormones, qui peuvent être membranaires, ou sécrétées suite à une stimulation. Médiateurs de la communication intercellulaire, elles participent à la mise en place des réactions immunitaires et de l'inflammation. Dans l'immunité innée, les principales sources de CK sont les cellules dendritiques et les macrophages activés, dans l'immunité adaptative ce sont les LT. Les CK regroupent un ensemble hétérogène de molécules dont les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs de nécrose de tumeurs (TNF) auxquels s'ajoutent un certain de nombre de facteurs de croissance tel que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) ou le PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*). Chaque cytokine peut être synthétisée par plusieurs types de cellules et agir sur un grand nombre de cellules cibles sur lesquelles elle aura des actions variées.

1.4.3. Les anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines solubles produites par les lymphocytes B différenciés appelés plasmocytes.

1.3.3.1 Structure

L'unité structurale de base d'un anticorps comporte 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaînes lourdes identiques (chaînes H pour *« Heavy chain »*) et 2 chaînes légères identiques (chaînes L pour « *Light chain* ») (figure 2).

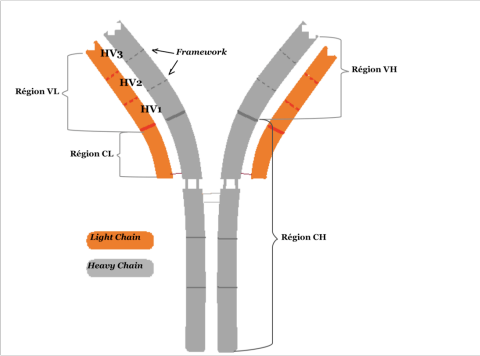


Figure 2. Structure d'un anticorps

Les anticorps sont formés de 4 chaînes polypeptidiques : 2 chaines lourdes et 2 légères. La région constante CH ou Fc permet la liaison des Ac aux cellules possédant le récepteur Fc.

Les chaînes L sont constituées de deux régions :

- Une région variable VL (pour « *Variable domain from Light chain* »), elle-même constituée par 3 régions hypervariables HV1, HV2, HV3.
- Une région constante CL (pour « *Constant domain from Light chain* ») d'un domaine immunoglobuline.

Il existe 2 types de chaînes L : κ et λ qui diffèrent par leur région constante.

Les chaînes H sont constituées de deux régions :

- Une région variable VH (pour « *Variable domain from Heavy chain* »), elle-même constituée par 3 régions hypervariables HV1, HV2, HV3.
- Une région constante CH (pour « *Constant domain from Heavy chain* ») d'un certain nombre de domaines immunoglobulines suivant l'isotype considéré : 3 pour les immunoglobulines IgG, IgA et IgD et 4 pours les immunoglobulines IgM et IgE.

Les Ac possèdent deux sites de liaison à l'antigène qui sont constitués par l'association des 3 régions hypervariables de la chaîne H (HV1, HV2 et HV3) aux 3 régions hypervariables de la chaîne L (HV1, HV2 et HV3). Les régions hypervariables prennent également l'appellation de CDR (pour « *Complementary Determining Region* ») et sont séparées par des régions dites « *framework* » qui permettent un maintien de la structure.

1.3.3.2 Les différents isotypes

Les immunoglobulines peuvent être classées en cinq groupes isotypiques qui se différencient par leur structure, leur taille, leur charge électrique et leur fonction: IgA, IgD, IgE, IgG et IgM (tableau 1).

Tableau 1. Caractéristiques des principaux isotypes d'anticorps

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Chaines lourdes	γ	α	μ	δ	ε
Sous-classe et chaines lourdes associées	IgG1 : γ1 IgG2 : γ2 IgG3 : γ3 IgG4 : γ4	IgA1: α1 IgA2: α2	-	-	-
Chaines légères	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	κ ou λ	ε ou λ
Nombre de monomères	1	1 (sérique) 2 (sérique ou secrétoire)	1 (membranaire) 5 (sérique)	1	1
Poids moléculaire (kD)	150	160 400	950 (sérique)	185	190
Concentration sérique (mg/mL)	8 à 16	2 à 4	0,5 à 2	0,05 à 0,4	0,0001 à 0,001
Proportion sérique	70 à 75%	15 à 20%	10%	Moins de 1%	Moins de 1%
½ vie sérique (j)	23	6	5	3	2 à 3
Caractéristiques principales	- Le plus abondant - Base de la réponse secondaire - Traverse le placenta	- Le plus abondant dans les sécrétions - Traverse les cellules épithéliales	-Base de la réponse primaire - faible affinité forte avidité	- Récepteurs des lymphocytes B matures	- Médiateur de l'allergie - Défense anti-helminthes

1.3.3.3 Les fonctions effectrices des anticorps

Selon leur isotype les Ac auront différentes fonctions effectrices. Les plus polyvalents étant les immunoglobulines G ou IgG (figure 3). Les anticorps agissent principalement de deux manières : soit de façon directe en neutralisant le pathogène soit en coopération avec d'autres acteurs du système immunitaire. Leur région variable est utilisée pour se lier au pathogène alors que la région constante assure l'interaction avec les protéines ou les cellules du système immunitaire.

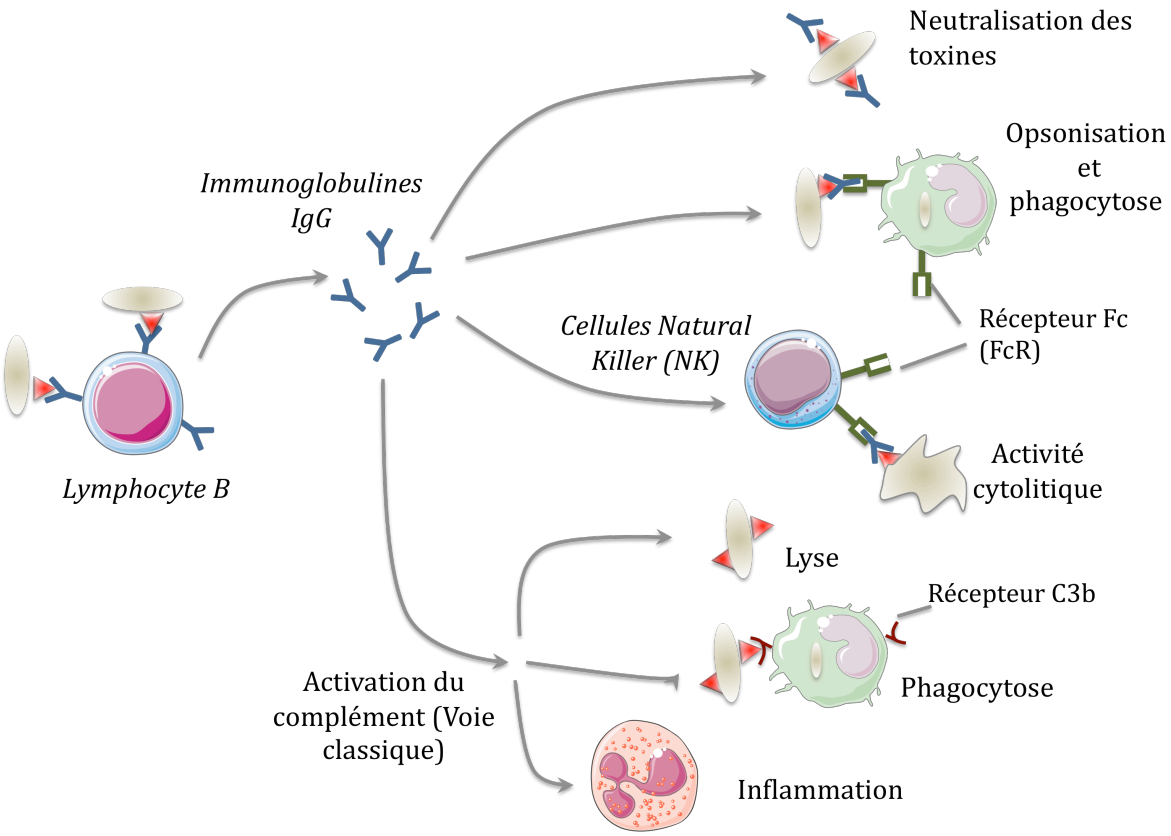


Figure 3. Différentes fonctions effectrices des IgG.

Les anticorps de différentes classes isotypiques assurent différentes fonctions effectrices allant de la neutralisation, à l'opsonisation. Les IgG peuvent également déclencher le processus de cytotoxité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (pour « antibody-dependent cellular cytotoxicity ») ou activer le système du complément. Adaptée de (Abbas et Lichtman, Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique, 3ème édition)

2. L'IMMUNOTHERAPIE

On distingue dans le terme général d'immunothérapie : l'immunothérapie active, passive ou adoptive. L'immunothérapie active ou vaccination consiste à stimuler ou à moduler une réponse immunitaire spécifique chez un individu. L'immunothérapie passive consiste à administrer une source d'anticorps spécifiques alors que l'immunothérapie adoptive utilise des effecteurs immunitaires compétents tels que les cellules dendritiques ou les lymphocytes T.

2.1 UN PEU D'HISTOIRE

Les premiers exemples d'immunisation datent du XVIème siècle et concernent la variole. Utilisée par les Chinois, ensuite développée à Constantinople, la variolisation arrive vers le XVIIIème siècle en Occident. L'origine de la vaccination est cependant le plus souvent attribuée à Edouard Jenner. En 1796, ce médecin anglais établit la première démonstration scientifique de la possibilité d'utiliser le système immunitaire pour se défendre d'une infection. En effet, il prouve que le pus issus de la variole bovine, appelé la vaccine, protège l'homme de la variole. La variolisation connaît, dès lors, un succès retentissant en Europe continentale avec l'organisation de grandes campagnes de vaccination. Le principe de la vaccination, lui, n'est mis en évidence qu'en 1881 par Louis Pasteur suite à ces travaux sur le choléra des poules. En 1885, il effectue la première vaccination humaine contre la rage (pour revue Lombard et al., 2007). Peu de temps après, Paul Elrlich et William Coley pense à étudier cette approche pour traiter le cancer (pour revue Waldmann, 2003).

En 1888, Emile Roux et Alexandre Yersin découvrent la toxine diphtérique. Deux ans plus tard, Emil Adolf von Behring et Shibasaburo Kitasato mettent en évidence une antitoxine dans le sérum des patients qui avaient survécu à la diphtérie. Ce sont les premiers pas de l'immunothérapie passive. En 1975 Georges Köhler, Niels Kaj Jerne et César Milstein décrivent une méthode de production d'anticorps monoclonaux révolutionnaire : la technique des hybridomes (Kohler et Milstein, 1975). Cette découverte eut un impact majeur sur la recherche fondamentale, ainsi que pour le diagnostic et le traitement de maladies, et ils reçurent en 1984 le prix Nobel de médecine. Depuis l'approbation, en 1986, du premier anticorps monoclonal muromonab-CD3 par la Food and Drug Administration (FDA) les avancés dans le domaine de l'immunologie ont permis l'émergence de nouveaux concepts et des progrès considérables dans les approches thérapeutiques mettant en jeu le système immunitaire.

2.2 PRINCIPE DE LA VACCINATION

La vaccination est un procédé consistant à introduire un agent extérieur (le vaccin) dans un organisme vivant afin de créer une réaction immunitaire positive contre une maladie infectieuse. Elle consiste à stimuler les réponses immunitaires adaptatives que sont l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Les anticorps, sécrétés par les plasmocytes,

assurent l'immunité humorale. Le développement d'une réponse humorale peut se faire de deux manières distinctes en utilisant, ou non, l'aide des lymphocytes T auxiliaires (réponses T-dépendantes ou- indépendantes). L'engagement vers l'une ou l'autre des réponses se fait en fonction de l'antigène rencontré. Ainsi la réponse immunitaire adaptative repose sur plusieurs étapes qui mettent en jeu différents acteurs de l'immunité (figure 4).

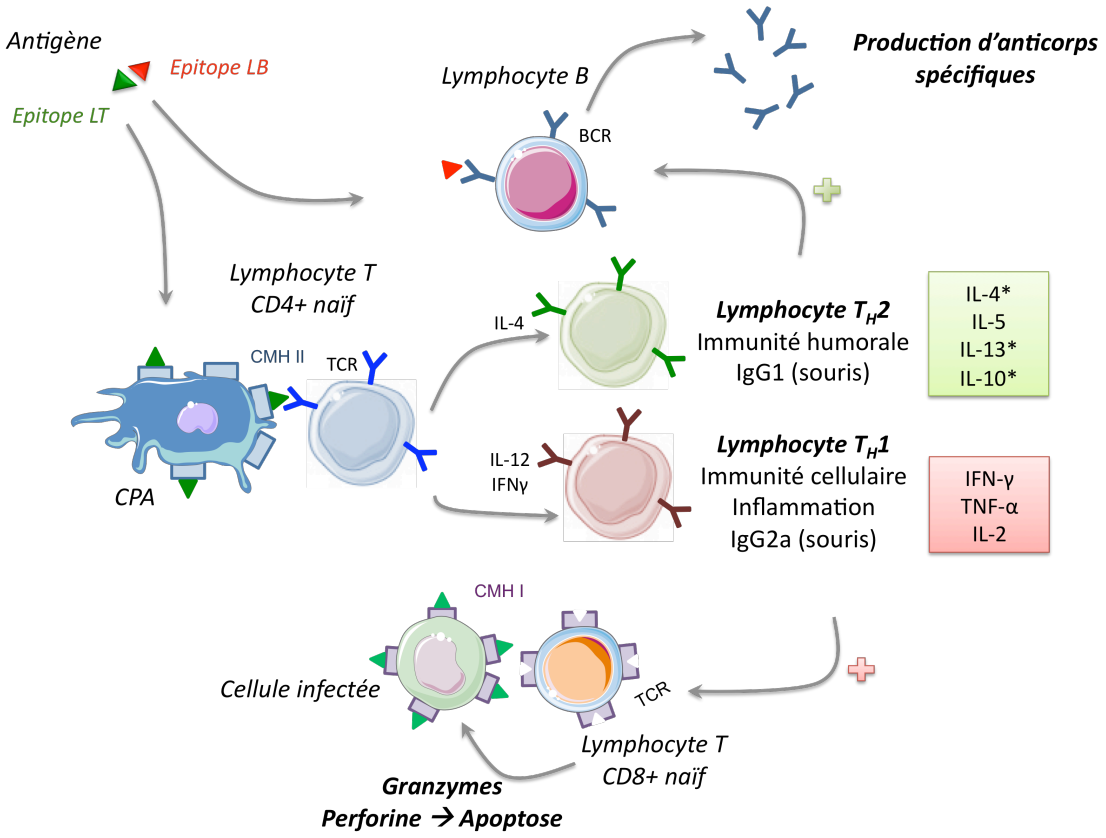


Figure 4. Résumé simplifié des réactions immunitaires en réponse à l'introduction d'un antigène peptidique.

La réponse immunitaire se développe dans les organes lymphoïdes périphériques. En dehors des cas où l'antigène stimule exclusivement les lymphocytes B (Ag T-indépendants), la plupart des réponses immunitaires impliquent une coopération entre lymphocytes T et B. Les interactions CPA et lymphocytes T mettent en jeu la synthèse de cytokines qui vont orienter la réponse immunitaire. Ici de manière simplifiée, l'orientation peut se faire vers une réponse de type T_H1 favorisant une réponse de type cellulaire impliquant les LT CD8+ et l'activation des macrophages ou une réponse de type T_H2 favorisant une réponse humorale et régulant l'activité des macrophages.

2.1.1. Les différents vaccins

On peut distinguer différentes classes de vaccins. Les vaccins atténués ou inactivés qui regroupent des préparations vaccinales contenant un pathogène complet inactivé ou ayant

perdu sa virulence. On trouve par exemple les vaccins contre la poliomyélite et la rage (virus vivants atténués) ou encore le BCG (Bacille de Calmette de Guérin, souche atténuée de *Mycobacterium bovis*). Il existe également une classe de vaccin, mieux tolérée, dit vaccins sous-unités comme l'anatoxine tétanique ou diphtérique. Ces vaccins sont composés de protéines et polysaccharides microbiens. Par ailleurs, les vaccins actuels peuvent également être « conjugués », c'est-à-dire qu'ils contiennent un antigène de l'agent infectieux associé à une protéine porteuse telle que la toxine diphtérique. Cette technique permet d'induire une meilleure réponse immunitaire notamment chez l'enfant, même très jeune. Les vaccins conjugués sont par exemple utilisés pour vacciner contre l'*Haemophilus influenza* de type b ou encore les infections à pneumocoques. Enfin, certains vaccins récents sont fabriqués par génie génétique, ils contiennent une partie du virus, de l'enveloppe du virus ou de la bactérie, reconstitué par génie génétique. Les vaccins à vecteur viraux sont également à l'étude pour traiter différentes pathologies et notamment dans le traitement du cancer. Ils peuvent notamment exprimer un ou plusieurs antigènes d'intérêt vaccinal dans le cytoplasme des cellules infectées ce qui leur permet donc d'accéder à la présentation par des molécules du CMH I et à la reconnaissance par les T CD8+.

De manière générale, l'immunogénicité d'un vaccin dépend des facteurs propres à l'antigène, notamment sa morphologie, sa nature chimique et sa masse moléculaire, de la voie d'administration et de l'utilisation d'adjuvants. En outre, plus la masse moléculaire est élevée, plus l'antigène est immunogène. Les peptides synthétiques sont ainsi conjugués à une protéine porteuse afin de les rendre plus immunogènes. Parmi les principales protéines utilisées pour la conjugaison dans la fabrication des vaccins actuels on trouve par exemple la BSA (*Bovine Serum Albumin*) ou encore la KLH (*Keyhole Lympet Hemocyanin*). Généralement, les adjuvants sont utilisés pour renforcer le pouvoir immunisant du vaccin afin d'obtenir une meilleure réponse sérologique et d'assurer une immunité plus durable.

2.1.2. Les différents adjuvants

Il existe de nombreux adjuvants, de nature et d'origine diverses (Vermout et al., 2003 ; Reed et al., 2009) caractérisés par leur capacité à activer sélectivement les lymphocytes T CD4+ de type T_H1 ou T_H2. Les adjuvants agissent en prolongeant la présence des antigènes au point d'injection (Stills, 2005). Cela permet leur libération sur une période de temps variable

ainsi que l'activation des CPA et la sécrétion de certaines cytokines qui vont définir le type de réponse. Les adjuvants peuvent agir selon plusieurs mécanismes présentés à la figure 5, qui ne sont pas exclusifs les uns des autres.

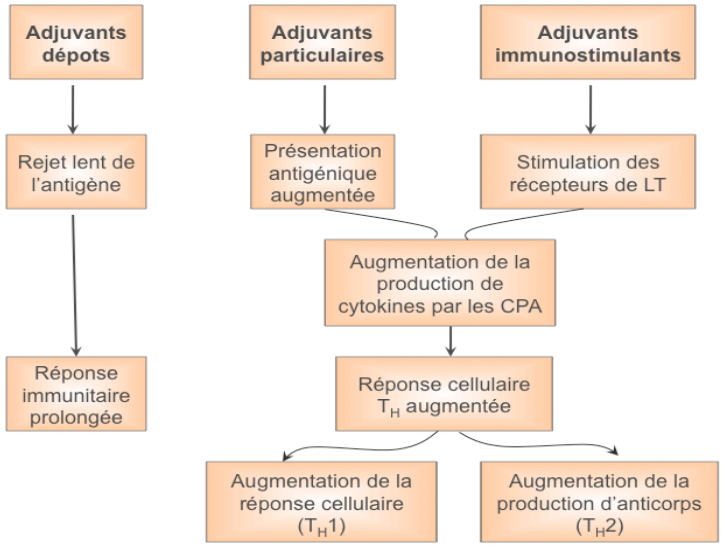


Figure 5. Mode d'action des adjuvants.

Parmi ces adjuvants, les adjuvants à base d'aluminium, regroupés généralement sous le terme « Alum », qui favorisent une réponse de type T_H2 conduisant à la synthèse de'IL-4 et d'IL-5 par les LT activés, sont les plus utilisés chez l'homme. Leur sureté est cependant soumise à controverse (Tomljenovic et Shaw, 2011).

2.2 IMMUNOTHERAPIES PASSIVE ET ADOPTIVE

L'immunothérapie passive consiste à transférer directement les effecteurs de l'immunité adaptative humorale : les anticorps.

Les anticorps sont dérivés d'un clone unique de cellules produisant des anticorps dirigés contre un seul antigène, ils sont alors appelés : anticorps monoclonaux. Les Ac présentent l'avantage d'être transférables d'un individu à un autre, et de pouvoir s'attaquer aux cellules cibles sans activation préalable du système immunitaire du receveur.

L'immunothérapie adoptive consiste à l'injection de cellules manipulées *ex vivo* et réinjectées chez le patients. Ce type d'immunothérapie, aussi appelée transfert adoptif qui utilise des cellules dendritiques, macrophages ou des lymphocytes, est particulièrement utilisée dans le domaine du cancer (Klebanoff et al., 2011).

II. IMMUNOTHERAPIE ET PROTEINOPATHIES NEURODEGENERATIVES

Depuis l'éradication de la variole, le champ d'application de la vaccination et, de façon plus générale de l'immunothérapie, s'est étendu avec succès aux cancers, aux maladies auto-immunes (Sela et Hilleman, 2004) et plus récemment aux maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson (Brody et Holtzman, 2008).

1. DES AGREGATS PROTEIQUES EXTRANEURONAUX…

1.1 LA MALADIE D'ALZHEIMER

Tout comme un certain nombre d'affections, la découverte de la maladie d'Alzheimer (MA) est étroitement liée à une série d'exposés de cas. Auguste D fût le premier à être décrit en 1906 par le neuropathologiste allemand Aloïs Alzheimer. L'expression « maladie d'Alzheimer » sera introduite pour la première fois dans la 8e édition du manuel de psychiatrie d'Emil Kraepelin en 1910.

1.1.1. Généralités

1.1.1.1 Clinique

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une altération progressive et irréversible des fonctions cognitives. La maladie débute généralement par une perte de mémoire épisodique concernant dans un premier temps les faits récents. Progressivement, des troubles du langage (aphasie), des troubles praxiques (gestes intentionnels) ou encore des troubles des fonctions exécutives vont apparaître. Les patients sont également sujets à des troubles comportementaux de type dépression, agressivité et désinhibition sexuelle. A terme le patient perd progressivement son autonomie et décède après 5 à 15 ans d'évolution.

1.1.1.2 Lésions neuropathologiques

Le cerveau des patients atteints de la MA révèle une atrophie cortico-sous-corticale et la présence de 2 lésions histopathologiques: les dépôts amyloïdes extracellulaires et la dégénérescence neurofibrillaire intraneuronale. C'est la présence conjointe des 2 lésions qui permet de faire le diagnostic certain de maladie d'Alzheimer.

a. Dépôts amyloïdes

Les dépôts amyloïdes sont constitués de peptides β-amyloïde ou Aβ d'une quarantaine d'acides aminés (Glenner et Wong, 1984) (figure 6). Certaines plaques amyloïdes sont entourées par une couronne de neurites en dégénérescence neurofibrillaire. Elles sont nommées "plaques neuritiques" ou "plaques séniles".

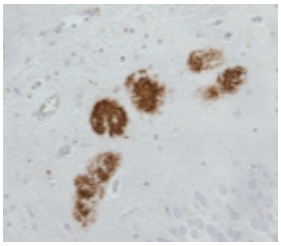


Figure 6. Aspect histologique des dépôts amyloïdes extracellulaires

Dépôts amyloïdes extracellulaires dans le cortex des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Tirée du manuscrit de thèse de Sylvie Burnouf 2010.

Ces peptides Aβ sont issus du clivage de la glycoprotéine transmembranaire APP (Amyloid Protein Precursor) par les β- et γ-sécrétases selon une voie dite amyloïdogénique (figure 7). L'activité γ-secrétase donne une grande hétérogénéité carboxy-terminale avec des peptides se finissant aux résidus 38, 40, 42, 43, etc…

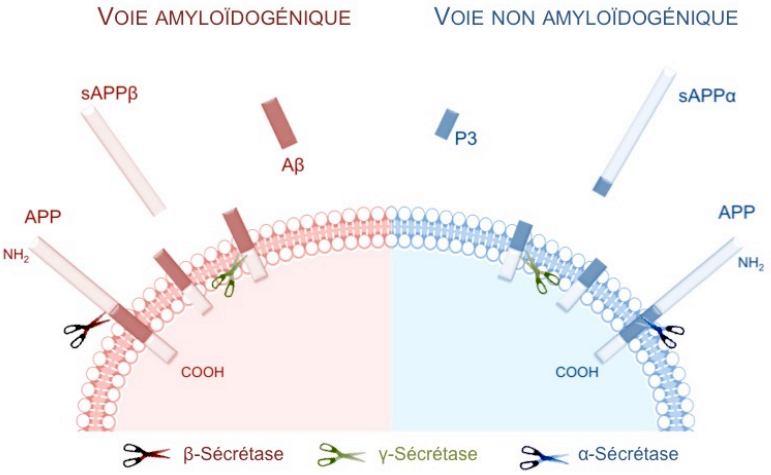


Figure 7. Métabolisme de l'APP.

La voie amyloïdogénique va conduire à la formation de peptides Aβ grâce à l'action des β et γ-sécrétases. La voie non amyloïdogénique met en jeu l'α-sécrétase qui va cliver l'APP au niveau du fragment Aβ et ainsi empêcher sa formation.

Les formes $A\beta_{1-42}$ (clivées en acide aminé 42) majoritaires au sein des dépôts amyloïdes sont plus agrégatives que les formes Aβ1-40 (Burdick et al., 1997). La deuxième voie protéolytique, dite « non amyloïdogénique », implique l'α-sécrétase qui va couper au milieu de la séquence Aβ, prévenant ainsi sa production. Cette coupure permet la libération du fragment sAPPα qui est connu pour être un facteur trophique et neuroprotecteur (Mattson et al., 1997).

Les dépôts amyloïdes vont apparaître dans un premier temps dans l'ensemble des régions néocorticales (cortex frontal, pariétal, temporal et occipital). Les lésions vont ensuite s'étendre aux régions plus internes (cortex entorhinal, hippocampe, striatum) jusqu'à atteindre le tronc cérébral et le cervelet (Thal et al., 2002).

b. Dégénérescence neurofibrillaire

La deuxième lésion neuropathologique qui caractérise la MA est le neurone en dégénérescence neurofibrillaire (DNF). Ce phénomène résulte de l'agrégation intraneuronale de PHFs (*Paired Helical Filament*) ou paires de filaments appariées en hélice (Kidd et al., 1963). Les PHFs sont retrouvées dans les corps cellulaires, dans les dendrites ainsi que dans les neurites anormaux associés avec les plaques séniles. Les PHFs sont majoritairement composées de protéines Tau (*Tubulin Associated Unit*) hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées (Brion et al., 1985 ; Grundke-Iqbal et al., 1986 ; Greenberg et al., 1992).

La DNF démarrerait dans le locus cœruleus pour se propager au cortex trans-entorhinal (Braak and Del Tredici, 2011a, b). Ensuite, elle se retrouve dans le cortex entorhinal et l'hippocampe (régions fortement impliqués dans les processus de mémorisation). Elle atteint ensuite les aires polymodales puis unimodales, pour enfin envahir l'ensemble du cortex dans les stades les plus avancés de la maladie (Braak and Braak, 1991 ; Duyckaerts et al.,1997 ; Delacourte et al., 1999). Cette 2ème lésion est commune à plusieurs maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de Tauopathies, un chapitre y sera consacré.

1.1.1.3 Etiologie

World Alzheimer Report 2010 estimait à 35,6 millions le nombre de personnes souffrant de MA ou de démences apparentées en 2010 dans le monde. Elle apparaît généralement après 65 ans, de façon sporadique, mais dans moins de 0,3% des cas, la MA

peut apparaître de façon très précoce, dès l'âge de 30 ans (Campion et al., 1990 ; Selkoe, 2001). Bien que les mécanismes à l'origine de la maladie ne soient pas clairement déterminés, la MA semble être une multifactorielle. Parmi l'ensemble des facteurs de risque mis en cause, l'âge représente le facteur le plus important. Les facteurs vasculaires comme l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, les accidents vasculaires cérébraux et le diabète de type 2 sont également associés à un risque accru de développer la maladie. Certains facteurs génétiques ont été récemment identifiés par la réalisation de génotypage à haut débit de cas atteints de maladie d'Alzheimer et de témoins (Seshadri et al., 2010 : Hollingworth et al., 2011). L'allèle ε4 de l'apolipoprotéine E fut le premier identifié et représente celui ayant le plus grand impact (Mayeux et al., 1993 ; Genin et al., 2011).

Les formes familiales précoces sont dues à des mutations sur les gènes de l'APP (Chartier-Harlin et al., 1991) et des enzymes nécessaires à son métabolisme, les présénilines 1 et 2 (PS1, PS2) (Sherrington et al, 1995 ; Levy-Lahad et al., 1995). Elles sont systématiquement liées à la surproduction de peptide β-amyloïde issu du métabolisme de l'APP (Suzuki et al., 1994 ; Citron et al ., 1997), ce qui a placé ce métabolisme au centre du processus pathologique.

Le lien de causalité entre mutations, fonctions des gènes mutés et développement de la maladie a permis l'émergence d'une hypothèse physiopathologique qui a orienté notre compréhension de la maladie d'Alzheimer de façon radicale: l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et Allsop, 1991). Cette hypothèse suggère que la modification de la production des formes d'Aβ conduit à la dégénérescence neurofibrillaire puis à la mort neuronale (Hardy, 1997). Ce principe évolue avec le temps et on considère maintenant que la qualité des espèces Aβ produites et la clairance d'Aβ sont responsables de la cascade d'événements conduisant à la maladie d'Alzheimer (Citron M, 2010).

Basées sur cette « hypothèse de la cascade amyloïde », de nombreuses approches thérapeutiques ciblant les dépôts amyloïdes ont été développées (pour revues, Citron M, 2010; Mangialasche et al., 2010). Parmi ces stratégies, l'immunothérapie est très vite apparue comme particulièrement prometteuse (pour revue Pul et al., 2011 ; Lemere et Masliah, 2010 ; Wisnieswski et Boutajangout, 2010).

1.1.2. Immunothérapie Active

Le concept d'immunothérapie anti Aβ vient des études menées par Beka Solomon et son groupe en 1996. Ces études ont non seulement démontré que des anticorps dirigés contre le peptide $A\beta_{1-42}$ étaient capables d'inhiber son agrégation *in vitro* mais également de resolubiliser des précipités (Solomon et al., 1996). L'action de ces anticorps a aussi permis de limiter la toxicité d'Aβ *in cellulo* (Solomon et al., 1997).

1.1.2.1 Etudes précliniques (1999 à 2001)

En 1999, Dale Schenk et ses collaborateurs publient la première étude d'immunothérapie dirigée contre le peptide Aβ, *in vivo*. Des injections sous cutanées de peptide $A\beta_{1-42}$ agrégé, émulsifié avec de l'adjuvant de Freund, ont été effectuées chez des souris transgéniques PDAPP en traitement préventif et curatif. Les deux approches ont généré une réponse immunitaire importante, associée à une réduction des dépôts amyloïdes, des neurites dystrophiques et de l'astrogliose (Schenk et al., 1999). L'année suivante, deux groupes ont reproduit ces résultats dans d'autres modèles de souris transgéniques APP en mettant également en évidence une amélioration de la mémoire spatiale (Janus et al., 2000 ; Morgan et al., 2000). L'immunisation par voie nasale avec différentes substances immunogènes notamment $A\beta_{1-40}$ (Weiner et al, 2000) ou la séquence ERFH (acides aminés 3 à 6) du peptide $A\beta_{1-42}$ délivrée par des phages (Frenkel et al, 2000 ; Lemere et al., 2001) a également généré des résultats encourageants. Néanmoins les effets sur la pathologie amyloïde ne sont pas toujours aussi marqués que ceux obtenus par l'équipe de Dale Schenk chez les souris PDAPP.

1.1.2.2 Etudes cliniques (2000 à 2002)

Les résultats des études précliniques ne montrant aucun effet secondaire délétère, les sociétés *Wyeth et Elan Pharmaceuticals* lancent un essai de phase I en 2000 (Bayer et al, 2005). Le vaccin AN-1792, constitué de peptide $A\beta_{1-42}$ agrégé et d'un adjuvant QS-21, a été délivré par voie intramusculaire chez 80 patients à 4 doses. Les résultats de cette première étude ont montré une bonne tolérance du vaccin, et aucune complication associée à la vaccination. En octobre 2001, une étude de phase IIa a été initiée sur 375 patients de stade léger ou modéré. En janvier 2002, l'essai a été stoppé suite à des cas de méningo-encéphalites

(Senior, 2002). Aucune corrélation avec le nombre d'injections ni le titre en anticorps anti $A\beta_{1-42}$ dans le sérum n'a été mise en évidence (Orgogozo, 2003). Les quelques études autopsiques suggèrent l'implication de lymphocytes T dans ces méningo-encéphalites (Nicoll et al., 2003 ; Ferrer et al., 2004). Cette infiltration serait due à l'adjuvant utilisé, le QS-21, qui est un inducteur de réponse de type T_H1 (Pride et al., 2008) ou encore à la présence d'épitope de reconnaissance des LT sur le peptide amyloïde (Monsonego et al., 2003).

Néanmoins, les études révèlent également une élimination des plaques amyloïdes généralement accompagnée d'une activation microgliale et/ou d'une accumulation d'amyloïde dans les vaisseaux (Nicoll et al., 2003, 2006 ; Ferrer et al., 2004 ; Masliah et al., 2005). Aucun effet favorable n'a été observé sur la DNF ni sur l'angiopathie amyloïde cérébrale (Masliah et al., 2005 ; Nicoll et al., 2006). En utilisant des batteries de tests neuropsychologiques particuliers, une amélioration cognitive très légère a été observée chez les patients vaccinés répondeurs (Hock et al., 2002 ; Gildman et al., 2005 ; Vellas et al., 2009).

L'ensemble des études consécutives à l'essai AN-1792 a conduit à une stratégie claire pour les essais ultérieurs : réduire impérativement l'induction de réponses cellulaires de type T_H1.

1.1.2.3 La deuxième génération de vaccin anti-Aβ

La nouvelle génération de vaccin a pour but de minimiser l'intervention des lymphocytes T et particulièrement l'activation d'une réponse de type T_H1 pro inflammatoire (pour revue Lemere, 2009 ; Ghochikyan, 2009 ; Tabira, 2010). Plusieurs facteurs sont en mesure d'orienter le type de réponse immunitaire.

a. Séquence épitopique du peptide Aβ

Le peptide $A\beta_{1-42}$, utilisé dans la première génération de vaccin dans sa forme entière, contient les déterminants antigéniques T (Monsonego et al., 2003) suspectés d'être à l'origine des cas de méningo-encéphalites de l'essai vaccinal AN-1792. Ainsi, la nouvelle génération de vaccin a privilégié le domaine N-terminal notamment les 15 premiers acides aminés contenant la séquence d'activation des cellules B (Lemere et al., 2001 ; Sigurdsson et al., 2001 ; Frenkel et al., 2000). Plusieurs études rapportent l'utilisation de courts fragments du domaine N-terminal du peptide Aβ conjugués à de nombreux Co stimulateurs capables

d'induire une réponse immunitaire de type humorale. Parmi ces vaccins, on trouve, par exemple, le peptide $A\beta_{1-15}$ conjugué à un épitope T universel de fixation de l'antigène HLA-DR ou PADRE (Agadjanyan et al., 2005) ou encore des particules virales (Jennings et Bachmann, 2008).

b. Adjuvants

L'adjuvant a également été mis en cause dans les cas de méningo-encéphalites (Pride et al., 2008). En 2003, une étude de Cribbs (Cribbs et al, 2003) a montré que l'adjuvant complet de Freund et le QS-21 induisent une forte réponse immunitaire de type T_H1 alors que l'alum génère une réponse de type T_H2. D'autres approches sont capables de stimuler la réponse immunitaire de type T_H2 notamment l'utilisation de vecteurs adénoviraux (Kim et al., 2005) ainsi que l'utilisation d'IL4 et GM-CSF en remplacement de l'adjuvant (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*) (DaSilva et al., 2004).

c. Mode d'administration

Le mode d'administration met également en jeu différents types de réponse et fait parti des approches étudiées. Les vaccinations par voie nasale (Weiner et al., 2000 ; Lemere et al., 2001) génèrent préférentiellement des réponses T_H2. La vaccination avec le peptide $A\beta_{1-42}$ associée à la toxine cholérique injecté par la voie transcutanée a également donné des résultats encourageants (Nikolic et al., 2007).

A ce jour, plusieurs essais cliniques de vaccination sont développés ciblant toutes la partie N-terminale du peptide Aβ (tableau 2) (pour revue Lemere et Masliah, 2010). *Wyeth et Elan Pharmaceuticals* ont développé un nouveau vaccin ACC-001 composé du fragment 1-6 du peptide Aβ rattaché à une protéine porteuse. Il y a actuellement plusieurs essais cliniques de phase II sur des patients à un stade léger à modéré qui ne montrent aucun effet défavorable. Novartis a également un vaccin ciblant les 6 premiers acides aminés du peptide conjugué à une particule virale Qβ. Les premiers résultats (clinique, IRM ou Imagerie par Résonance Magnétique, LCR ou Liquide Céphalo Rachidien) ne montrent aucune différence entre le groupe placebo et le groupe vacciné (Winblad et al., 2009).

Tableau 2. Essais cliniques d'immunothérapies actives anti-Aβ

PHASE	PRODUIT	EPITOPE	VOIE	COMPAGNIE	RÉFÉRENCE
II	ACC-001 + QS-21	$A\beta_{1-7}$ (Nt)	i.m	Wyeth & Elan	NCT00960531
II	CAD-106	$A\beta_{1-6}$ (Nt)	s.c/i.m	Novartis	NCT01097096
I	Affitope AD01/ AD02	N-t	s.c	Affiris	NCT00711139
I	V950 (Iscomatrix)	-	i.m	Merck	NCT00464334
Ib	UB311	$A\beta_{1-14}$ (Nt)	i.m	United Biomedical	NCT00965588

i.m : intramusculaire - s.c : sous cutanée

1.1.3. Immunothérapie Passive

1.1.3.1 Etudes précliniques

Contrairement à l'immunothérapie active, l'immunothérapie passive utilise directement des anticorps spécifiques dirigés contre Aβ. Cette approche présente l'avantage de cibler des épitopes spécifiques d'Aβ et de contrôler la quantité d'Ac administrée tout en ayant la possibilité d'interrompre le traitement si des effets secondaires étaient observés. L'immunothérapie passive dirigée contre le peptide Aβ a été étudiée parallèlement à la vaccination. En 2000, Bard et ses collaborateurs publient la première étude de transfert passif chez des souris PDAPP âgées de 11 mois avec différents anticorps. Ils montrent que les anticorps dirigés contre la partie N-terminale du peptide Aβ sont efficaces contrairement aux Ac ciblant la partie C-terminale (Bard et al., 2000). Un transfert passif avec l'anticorps m266, dirigé contre la partie centrale du peptide Aβ, est également capable de réduire les plaques amyloïdes chez des souris PDAPP âgées de 4 mois (DeMattos et al., 2001). Une augmentation du taux d'Aβ dans le plasma des souris injectées a été observée, suggérant un transfert entre le système nerveux et le sang (DeMattos et al., 2001 ; Wilcock et al., 2004a). D'autres groupes ont également montré une amélioration des capacités cognitives suite aux injections des anticorps anti-Aβ dirigés contre la partie N-terminale et la partie centrale du peptide (Kotilinek et al., 2002 ; Dodart et al., 2002). L'autre lésion caractéristique de la MA, la pathologie Tau, a été étudiée par Oddo et ses collaborateurs suite à des injections intra-hippocampiques d'anticorps anti-Aβ (Oddo et al, 2004). Bien qu'une réduction des formes pré agrégatives de Tau soit observée, associée à une baisse des plaques amyloïdes, le traitement n'a pas d'effet sur la pathologie Tau à un stade plus avancé.

Bien que ce type d'approche offre plus de contrôle et de sûreté que la vaccination, des effets secondaires non négligeables ont été observés. En effet, plusieurs équipes ont rapporté la présence d'hémorragies intracérébrales suite à l'injection d'anticorps anti-Aβ (Pfeifer et al., 2002 ; Wilcock et al., 2004 ; Racke et al., 2005). Néanmoins, ces hémorragies probablement associées à l'angiopathie amyloïde cérébrale observée au cours de la maladie ne semblent pas avoir d'effets sur les améliorations cognitives observées (Wilcock et al., 2004).

Une autre approche d'immunothérapie passive est l'utilisation d'« intrabodies » (pour revues Messer et al., 2009 ; Solomon et Fenkel, 2010 ; Southwell et Patterson, 2009). Il s'agit de fragments d'anticorps recombinants qui ciblent des antigènes intracellulaires. Ils présentent les avantages des anticorps classiques notamment une forte spécificité et affinité pour les épitopes cibles mais sont de plus petites tailles et peuvent être manipulés et délivrés comme des gènes. *In vivo*, les intrabodies délivrés par AAV (*Adeno-Associated Virus*) (Sudol et al., 2009) dans un modèle de souris triple transgénique a conduit à la réduction partielle d'$A\beta_{1-42}$ et la réduction de la protéine Tau phosphorylée en Thr 131.

1.1.3.2 Etudes cliniques

Plusieurs essais cliniques d'immunothérapie passive sont en cours (tableau 4), le plus avancé étant le Bapineuzumab en phase III en (Kerchner and Boxer, 2010 ; Panza et al., 2011). Cet anticorps monoclonal humanisé dérive de l'anticorps murin 3D6 dirigé contre la partie N-terminale du peptide ($A\beta_{1-5}$). Le deuxième anticorps monoclonal en essai clinique de phase III, le Solanezumab, correspond à la version humanisé de m266 (DeMattos et al., 2001 ; Dodart et al., 2002) dirigé contre le partie centrale du peptide ($A\beta_{13-28}$). La différence entre ces 2 anticorps réside surtout dans la spécificité vis à vis des formes d'Aβ. Le Solanezumab est principalement dirigé contre les formes solubles d'Aβ et n'a que très peu d'affinité pour les formes fibrillaires contrairement au Bapineuzumab. Le Bapineuzumab administré par voie intraveineuse à des patients atteints d'un stade léger à modéré de la maladie d'Alzheimer, diminue la charge amyloïde observé par tomographie par émission de positons (PET) (Rinne et al., 2011a,b). Mais le traitement soulève également des inquiétudes car certains patients inclus dans l'essai de phase II ont développé des œdèmes vasogéniques (Salloway et al., 2009). Le premier bilan de la phase II du Solanezumab (Siemers et al., 2010) indique une bonne tolérance du traitement sans aucun signe de microhémorragies ou d'œdèmes. Ces

conclusions ont été récemment confirmées à la conférence internationale de l'ICAD 2011 où les résultats préliminaires de l'étude de phase III ont été présentés.

Une autre approche d'immunisation passive, initiée par Richard Dodel et ses collaborateurs, est l'utilisation d'immunoglobulines humaines (pour revue Dodel et al., 2010). L'idée vient de la découverte d'auto-anticorps anti-Aβ dans le sang de patients non immunisés (pour revue Weskler, 2005). Ces anticorps humains sont capables d'inhiber la formation d' Aβ fibrillaire et la toxicité induite par Aβ *in vitro* (Du et al, 2003). En 2004, le groupe de Richard Dodel publie les résultats de l'administration mensuelle d'immunoglobulines intraveineuses (IVIg) à une dose de 1,2g/kg chez 5 patients Alzheimer pendant 6 mois (Dodel et al., 2004). Les premiers résultats indiquent une réduction de 30% des taux d'Aβ dans le LCR, et une augmentation d'Aβ total de 23% dans le sang. Les tests cognitifs (ADS Cog, MMSE et visuoconstruction) révèlent une amélioration cognitive chez 4 patients sur 5. Plusieurs études menées depuis ont confirmé l'intérêt d'une telle approche (Relkin et al. 2009, 2011 ; Kondo et al., 2011 ; Hara et al., 2011). A ce jour, les essais cliniques d'administration d'IVIg humaines ont atteint la phase III (tableau 3).

Tableau 3. Essais cliniques d'immunothérapies passives anti-Aβ

PHASE	PRODUIT	EPITOPE	VOIE	COMPAGNIE	ESSAIS CLINIQUES	RÉFÉRENCES
ANTICORPS MONOCLONAUX						
III	Bapineuzumab (AAB-001, ELN115727)	$A\beta_{1-5}$ (Nt) – IgG1	i.v	Janssen/Elan/Pfizer	NCT00996918, NCT00574132 NCT00676143, NCT00667810 NCT00575055, NCT00998764 NCT00937352	Kerchner & Boxer, 2010 Rinne et al., 2010
III	Solenazumab (LY2062430)	$A\beta_{13-28}$ - IgG1	i.v	Eli Lilly	NCT01127633, NCT00905372 NCT00904683	Siemers et al., 2010
II	Ponezumab (PF-04360365/ RN-1219)	$A\beta_{33-40}$ (C-t) - IgG2	i.v	Pfizer	NCT00722046 NCT00945672	Zhao et al., 2010* Wood et al., 2010*
I	Gantenerumab/ R1450/ RO4909832	-	i.v/s.c	Hoffmann-La-Roche	NCT00531804	-
I	MABT5102A	-	i.v/s.c	Genentech	NCT00736775 NCT00997919	-
I	GSK933776A	Nt - IgG2	-	GlaxoSimthKline	NCT00459550	-
ANTICORPS POLYCLONAUX						
III	Gammagard	-	i.v	Baxter Healthcare Corporation	NCT00818662	Hughes et al., 2009
II	Octagam	-	i.v	Octapharma	NCT00812565	Hughes et al., 2009

* Résumés Congrès i.v : intraveineuse - s.c : sous cutanée

1.1.4. Les mécanismes d'action potentiels de l'immunothérapie contre le peptide Aβ

Plusieurs mécanismes, non exclusifs, peuvent expliquer la réduction des dépôts amyloïdes (figure 8). Dale Schenk, dans ses premiers travaux, émet l'hypothèse d'une activation de la microglie par le fragment Fc des anticorps anti-Aβ (Schenk et al., 1999). Cette hypothèse est également suggérer par les travaux d'immunothérapie passive de Bard (Bard et al., 2000). En effet, certains anticorps anti-Aβ administrés en périphérie sont retrouvés associés aux dépôts amyloïdes attestant de leur passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ces anticorps, au sein du cerveau, peuvent faciliter la clairance des dépôts amyloïdes grâce à la microglie par un mécanisme médié par des récepteurs au fragment Fc. Enfin, les résultats de l'essai AN-1792 révèlent une activation microgliale autour des dépôts amyloïdes (Nicoll et al., 2003 ; Ferrer et al., 2004). Toutefois, d'autres études ont montré, en utilisant soit des fragments F(ab) dirigés contre la partie C-terminale du peptide Aβ (Bacskai et al., 2002), soit des animaux invalidés pour les récepteurs Fc (Das et al., 2003), que la microglie pouvait être activée de manière Fc-indépendante. En effet, l'activation de la

microglie peut être effectives par d'autres mécanismes notamment par le système du complément ou encore les lymphocytes T.

Une autre hypothèse nommée «effet siphon périphérique» (pour « *peripheral sink hypothesis* ») suggère que les anticorps anti-Aβ périphériques trappent le peptide Aβ circulant, déplaçant ainsi l'équilibre existant entre les formes centrales et circulantes d'Aβ vers le compartiment périphérique. En effet après injection périphérique, une nette augmentation de la concentration plasmatique du peptide Aβ a été notée en association avec une réduction de la densité de dépôts amyloïdes et des améliorations cognitives (DeMattos et al., 2001; Wilcock et al., 2004). Néanmoins, cette hypothèse séduisante est nuancée par certaines données expérimentales (pour revue Golde et al., 2009). En effet, cette augmentation rapide du peptide Aβ au niveau périphérique peut s'expliquer par l'effet stabilisateur des anticorps qui peut prolonger le temps de demi-vie du peptide (Levites et al., 2006a ; Seubert et al., 2008). Un autre mécanisme, à l'encontre de l'effet siphon périphérique, a été récemment proposé par Yamada et ses collègues (Yamada et al., 2009). Les anticorps (m266 dans leur étude) séquestreraient les formes monomériques d'Aß dans le SNC empêchant ainsi la formation de fibrilles toxiques d' Aß.

Les études princeps d'immunothérapie ont montré la capacité de certains anticorps à désagréger les fibrilles amyloïdes *in vitro* et à prévenir leur toxicité (Solomon et al., 1996, 1997). Ces mêmes anticorps ont confirmé leur potentiel effecteur *in vivo* suggérant une action directe sur les dépôts par des mécanismes similaires de désagrégation des fibrilles Aβ (Frenkel et al., 2000, 2001).

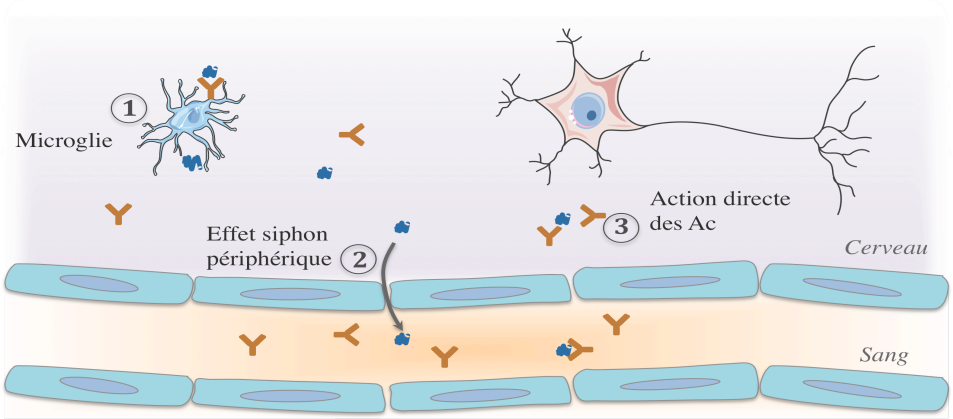


Figure 8. Principales hypothèses du mode d'action de l'immunothérapie Aβ

Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent expliquer la réduction des dépôts amyloïdes. L'activation de la microglie indépendamment ou non du récepteur Fc (1), l'action directe de désagrégation des anticorps (3) et l'effet siphon périphérique suggérant une clairance périphérique du peptide amyloïde (2).

Ainsi, l'immunothérapie contre les plaques amyloïdes apporte un réel espoir quant au traitement de la maladie d'Alzheimer. Les résultats des études précliniques menées notamment par l'équipe de Dale Schenk ont galvanisé la recherche scientifique. Ainsi, de manière quasi concomitante à la recherche dans la maladie d'Alzheimer, le concept d'immunothérapie a été étudié dans les maladies à prions.

1.1 LES MALADIES A PRIONS

Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST), plus communément appelées maladies à prions, constituent un ensemble de maladies neurodégénératives qui touchent aussi bien l'homme que l'animal. Ces affections sont causées par un agent définit par Stanley Prusiner sous le terme de « prion » (Prusiner, 1982).

1.2.1 Généralités

Les EST humaines comprennent la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) et son variant (vMCJ), le Kuru, le syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie fatale familiale (IFF). Ce sont des maladies assez rares qui se manifestent généralement par une démence progressive accompagnée de myoclonie (contraction musculaire), d'un syndrome cérébelleux ou de troubles visuels ainsi que d'un syndrome pyramidal/extrapyramidal.

La plus répandue est la MCJ qui correspond à 85% des cas. La majorité des cas sont d'origine sporadique (≈90%) ; les formes familiales (≈9%) sont liées à des mutations dans le gène *PRNP*, situé sur le chromosome 20 et codant la protéine prion. Les formes infectieuses (≈1%) peuvent être générées suite à des contaminations centrales iatrogènes. Parmi les contaminations les plus importantes et les plus médiatiques on peut citer le scandale des hormones de croissance extractive (hGH) et la crise de la vache folle. Aujourd'hui, il est couramment admis que le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), décrit pour la première fois en 1996, résulte de la transmission de l'encéphalopathie spongiforme bovine à l'homme par consommation de tissus contaminés.

Comme la plupart des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, les EST se caractérisent par une perte neuronale ainsi qu'une astrogliose associée à une activation microgliale. La lésion spécifique des maladies à prions est la spongiose qui correspond à une vacuolisation des neurones. Ces changements

s'accompagnent systématiquement d'agrégats constitués majoritairement de la protéine Prion anormale : PrPSc (Prusiner, 1982) (figure 9).

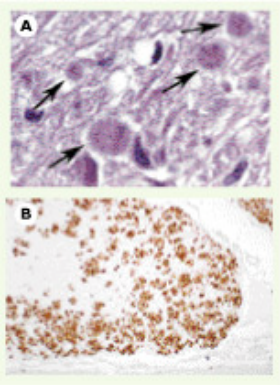


Figure 9. Aspect histologique des dépôts de protéine prion.

A. *Quatre plaques amyloïdes (flèches) observées dans le cerveau d'un patient décédé d'un syndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (coloration hématéine-éosine, x400).* ***B.*** *Immunomarquages anti-PrP d'innombrables agrégats de protéine prion observés dans le cadre d'une maladie de Creutzfeldt-Jakob familiale (x100) (clichés dus à l'amabilité du Pr Françoise Gray, Hôpital Lariboisière, Paris, France). Tirée de (Maldi et Fabrice, 2005).*

La séquence primaire de la PrPSc est identique à celle de la protéine normale PrPc, une protéine ubiquitaire présente majoritairement dans le cerveau et dans les organes lymphatiques dont la fonction exacte est, à ce jour, inconnue. Bien que les mécanismes de conversion ne soient pas totalement élucidés, on sait que l'association de la PrPSc à la PrPc induit un changement dans sa structure secondaire. La PrPc est composée d'environ 45% d'hélices α et peu de feuillets β alors que la PrPSc contient approximativement 30% d'hélices α et 45% de feuillets β. Les agrégats de PrPSc sont également résistants à la dégradation et à la digestion par la protéinase K contrairement à la PrPc.

A ce jour, il n'existe aucun traitement ni préventif ni curatif pour aucunes des formes de maladies à Prions. Les traitements thérapeutiques s'intéressent particulièrement aux processus de synthèse et d'accumulation de la PrPsc. Dans cette optique, l'immunothérapie est une stratégie particulièrement intéressante, d'autant plus que le système immunitaire joue un rôle important dans la réplication et l'accumulation de la PrPSc.

En 2001, deux équipes ont montré que des anticorps dirigés contre la protéine PrP étaient capables de bloquer la propagation du prion dans des cellules infectées (Enari et al., 2001 ; Peretz et al., 2001) confirmant l'intérêt de l'immunothérapie dans le traitement des maladies à prions.

1.2.2 Immunothérapie active

En 2001, Souan et ses collaborateurs sont les premiers à démontrer que la vaccination réduit la PrPSc tumorale chez des souris sauvages (Souan et al., 2001). Il est très vite apparu qu'obtenir une réponse immunitaire importante contre le prion serait difficile compte tenu de la tolérance naturelle au PrP qui est une protéine ubiquitaire. Afin de casser cette tolérance, plusieurs stratégies ont été mises en place. L'immunogénicité des peptides a été largement étudiée et plusieurs immunogènes testés : des peptides synthétiques couplés ou non à des protéines porteuses ou différents Ag tels que des protéines prions recombinantes ou encore des polyprotéines PrP-PrP. L'adjuvant de Freund a également été remplacé dans plusieurs études par le Montanide IMS-1313 ou le TiterMax, par des oligonucléotide CpG ou encore par la toxine cholérique (pour revues Heppner et Aguzzi, 2004 ; Bade et Frey, 2007). Bien que la plupart de ces études aient permis de générer des titres en anticorps plus importants les effets thérapeutiques bénéfiques, lorsqu'ils sont rapportés, sont très modérés (Sigurdsson et al., 2003 ; Arbel et al., 2003).

Puisque l'intestin est la principale voie d'entrée du prion dans de nombreuses formes de maladies à prions (Beekes and McBride, 2007), certains groupes ont pris le parti d'étudier la vaccination mucosale. Cette approche utilisée également dans la maladie d'Alzheimer, pour d'autres raisons, induit préférentiellement une réponse de type T_H2. La première démonstration de l'utilisation efficace de ce type de vaccination pour prévenir l'infection par le prion a été publiée en 2005 (Goni et al., 2005). Dans cette étude, 30% des animaux vaccinés avec une souche de salmonelle atténuée exprimant la protéine PrP n'ont pas développé la maladie à 365 jours après l'infection orale par le prion. L'immunisation mucosale a ensuite été confirmée comme partiellement protectrice contre l'infection par le prion par un autre groupe qui a utilisé comme vaccin un fragment de PrP recombinante et la toxine cholérique comme adjuvant (Bade et al., 2006). Plus récemment, Goni et ses collaborateurs ont constaté que 100% des souris immunisées, présentant les taux en IgA et IgG les plus élevés, étaient protégées de l'infection par voie orale (Goni et al., 2009).

1.2.3 Immunothérapie passive

L'immunothérapie passive est une approche qui a également été étudiée. Quelques équipes ont décrit des temps d'incubation prolongés suite à l'injection d'anticorps dirigés

contre la protéine prion par injection intrapéritonéale (ip) chez des souris infectées (Sirgurdsson et al., 2003 ; White et al., 2003 ; Féraudet et al., 2010). De manière générale, les résultats sont limités et surtout inefficaces dès lors que le cerveau est infecté et que les premiers signes neurologiques sont apparus et ce, même avec des doses massives d'anticorps (White et al., 2003). Il est donc difficile d'envisager de traiter les formes sporadiques et familiales de MCJ qui débutent dans le SNC de cette manière. Toutefois, les anticorps délivrés par infusion intraventriculaire ont un effet bénéfique non seulement sur la PrPSc mais également sur la spongiose, l'activation microgliale et l'astrogliose chez des souris ayant une infection cérébrale (Song et al., 2008). Il est donc probable que l'action des Ac soit limitée par la présence de la BHE. En effet, l'utilisation des différents ScFv délivrés par AAV directement dans le SNC de souris infectées permet de réduire l'accumulation de PrPSc et l'infection du prion (Vertugno et al., 2006 ; Wuertzer et al., 2008 ; Zuber et al., 2008).

1.2.4 Immunothérapie adoptive

L'immunothérapie adoptive, utilisée dans le domaine du cancer, est une approche alternative pour pallier à la tolérance naturelle au PrP ainsi qu'à la faible efficacité des anticorps (pour revue Carnaud et Bachy, 2010). Les études de transfert adoptif se sont centrées sur les lymphocytes T CD4+ ainsi que sur les cellules dendritiques.

Les cellules dendritiques, capables de stimuler la production de lymphocytes T naïfs jouent un rôle clé dans l'induction de la réponse immune. Des cellules dendritiques « chargées» avec une séquence peptidique de PrP, transduites (Rosset et al.2009) ou non (Bachy et al., 2010), administrées à des souris sauvages sont capables de casser la tolérance naturelle au prion. Ce tranfert adoptif génère à la fois des Ac dirigés contre PrPc ainsi que la libération de cytokines par les cellules T. Le transfert répété de ces cellules réduit l'infection du prion inoculé en ip et prolonge l'incubation de la maladie de 40 jours (Bachy et al., 2010). Le temps de survie semble corrélé avec le taux d'Ac circulants.

Les LT CD4+ jouent un rôle majeur dans les réponses de l'immunité adaptative aussi bien cellulaire qu'humorale. Le transfert de cellules T CD4+ sensibilisées à la protéine PrP a été étudié en utilisant des souris donneuses sauvages (partiellement ou totalement déplétées en lymphocytes) (Gourdain et al., 2009) et des souris transgéniques exprimant un TCR de CD4+ spécifique d'un motif de la protéine prion (Iken et al., 2011). Les lymphocytes T prolifèrent et

secrètent des cytokines plusieurs mois après leur transfert. Ils sont capables de réduire la progression de l'infection dans les organes lymphoïdes secondaires et ainsi retarder la progression de la maladie. De manière intéressante, la protection conférée par les lymphocytes T CD4+ s'exerce sans l'aide d'anticorps. Néanmoins, elle se développe dans un contexte T_H2 lié à une production d'IL-4 majoritaire par rapport à la production d'IFNγ. Cette approche met en avant le potentiel des cellules de l'immunité cellulaire et ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, les lymphocytes T ne sont pas uniquement pro inflammatoires et, modulés de façon adaptée, ils peuvent être bénéfiques notamment *via* la production de cytokines de type T_H2.

1.2.5 Les mécanismes d'action potentiels de l'immunothérapie contre le prion

Les mécanismes par lesquels les anticorps sont capables d'inhiber la formation de la PrPSc ont été étudiés en utilisant divers anticorps dans différentes lignées cellulaires. Plusieurs hypothèses ont émergées de ces différentes études. La première est que les anticorps modifient directement l'interaction entre la PrPSc et la PrPc en bloquant les épitopes nécessaires à la conversion (Enari et al. 2001 ; Peretz et al., 2001).

Une autre hypothèse serait que les anticorps indépendamment de leur spécificité perturbent le trafic cellulaire de la PrPc. Notamment sa séquestration à la surface cellulaire empêcherait sa conversion au sein des compartiments subcellulaires (Kim et al., 2004 ; Féraudet et al., 2005). Enfin, ces anticorps seraient capables de dégrader la PrPc (Perrier et al., 2004) générant toujours une moindre disponibilité du substrat nécessaire à la PrPSc. Enfin, il serait également possible que la PrPSc elle même soit plus facilement dégradée (Beringue et al., 2004). Il semblerait d'ailleurs que des anticorps dirigés à la fois contre la PrPSc et la PrPc seraient plus efficaces que ceux qui reconnaissent uniquement la PrPc (Beringue et al., 2004).

De manière générale, non seulement, les travaux sur le prion confirment l'intérêt de l'immunothérapie dans le traitement des maladies neurodégénératives mais mettent également en évidence le potentiel effecteur de l'immunité cellulaire, notamment des LT CD4+, jusque là considérés comme la bête noire de l'immunothérapie Aβ.

2. … AUX AGREGATS PROTEIQUES INTRANEURONAUX

2.1 LA MALADIE DE PARKINSON

2.1.1. Généralités

La maladie de Parkinson est, après la MA, la maladie neurodégénérative la plus fréquente chez les populations âgées. Il s'agit d'une maladie chronique qui se manifeste essentiellement par des troubles moteurs : tremblement au repos, rigidité, bradykinésie et instabilité posturale (pour revue Jankovic, 2008).

La MP est caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques de la substance noire. Ces neurones innervent massivement le striatum et interviennent, à ce titre, dans le contrôle et l'exécution du mouvement. A l'intérieur de ces neurones on retrouve une lésion particulière : le corps de Lewy. Il s'agit d'une inclusion intraneuronale majoritairement composée d'α-synucléine mal conformée (figure 10)(Spillantini et al., 1997b). L'α-synucléine est une protéine présynaptique dont le rôle n'est toujours pas clairement identifié.

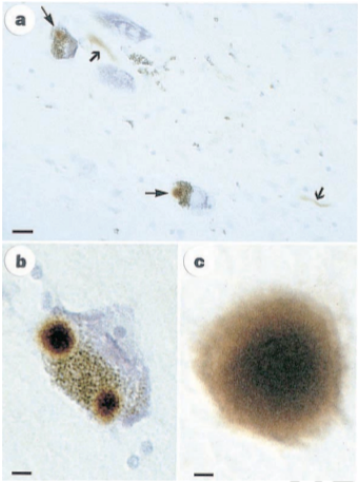


Figure 10. Aspects histologiques du corps de Lewy

A. Corps de Lewy de la substance noire de patient atteint de la maladie de Parkinson marqué avec un anticorps dirigé contre l' α-synucléine. Barre d'échelle 20µm B. Cellule nerveuse présentant 2 corps de Lewy. Barre d'échelle 8µm C. Corps de Lewy extracellulaire à plus fort grossissement. Barre d'échelle 4µm. D'après (Spillantini et al., 1997b)

La MP apparaît le plus souvent de façon sporadique. Bien que les mécanismes à l'origine de la maladie ne soient pas clairement déterminés, un ensemble de facteurs de risques tels que les pesticides ou encore le stress oxydatif ont été mis en cause (pour revue Defebvre, 2010). Les formes familiales sont rares, elles débutent généralement plus

précocement. Leur caractérisation a permis l'identification de plusieurs gènes de la maladie : *α-synucléine, parkin, ubiquitin-C-terminal hydrolase L1, DJ-1, ATP13A2* et *PINK1*.

Il n'existe à ce jour, comme pour la MA, aucun traitement préventif ni curatif, uniquement des traitements symptomatiques (pour revue Caviness et al., 2010). Une stratégie privilégiée est de réduire l'accumulation de l'α-synucléine en inhibant son agrégation ou en promouvant sa dégradation/clairance notamment par l'immunothérapie (pour revue Agbo et al., 2009). Bien que l'α-synucléine soit une protéine cytosolique, de ce fait moins accessible, en conditions pathologiques elle s'accumule à la membrane (Kim et al., 2009) et peut ainsi être exposée aux anticorps circulants. A ceci s'ajoute les récentes études qui suggèrent que l'α-synucléine peut être retrouvée à l'extérieur du neurone et participerait à la propagation de la pathologie selon un mécanisme proche de celui du prion (pour revues Aguzzi et Rajendran, 2009 ; Angot et al., 2010).

2.1.2. Immunothérapie active

Comme pour le peptide amyloïde et le prion, la preuve de concept vient d'études i*n vitro* qui ont montré que des ScFv étaient capables d'inhiber l'agrégation de l'α-synucléine (Emadi et al., 2004 ; Zhou et al., 2004). La première immunothérapie active ciblant l'α-synucléine a été développée par Eliezer Masliah et ses collaborateurs dans un modèle murin transgénique de Parkinson (Masliah et al., 2005b). Dans cette étude, des souris âgées de 3 et 6 mois ont été vaccinées avec de l'α-synucléine humaine (hα-syn) recombinante et de l'adjuvant de Freund pendant 8 mois. Chez les souris produisant les anticorps les plus spécifiques, une diminution de l'accumulation de l'hα-syn dans les corps neuronaux et les synapses a été observée ainsi qu'une réduction de la dégénérescence synaptique. La question qui se pose est bien évidemment comment les anticorps générés en périphérie sont-ils capables de reconnaître et de promouvoir la clairance d'une protéine intraneuronale ? Eliezer Masliah propose une hypothèse basée sur un co-marquage avec la cathepsine D, une protéase du lysosome. Les anticorps capables de reconnaître l'α-synucléine agrégée/oligomérisée, présente à la membrane, seraient internalisés, seuls, ou *via* un récepteur type Thy 1.1 ou LRP (*Lipoprotein Receptor-related Protein*) et faciliteraient la dégradation de l'α-synucléine par le lysosome (figure 11).

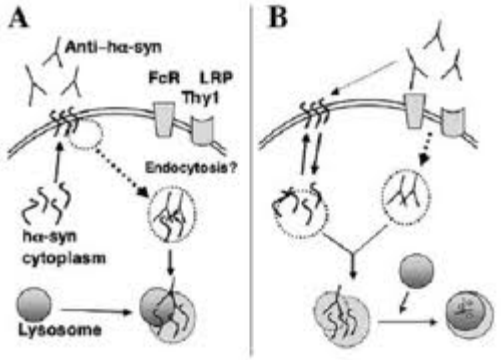


Figure 11. Mécanisme hypothétique de la dégradation de l'α-synucléine par les anticorps.

A. *Les anticorps peuvent reconnaître l'α-synucléine présente à la membrane. Le complexe serait ensuite endocyté et dégradé par le lysosome* ***B.*** *Les anticorps pourraient être endocytés par un mécanisme médié par un récepteur (FcR, Thy1, LRP) et facilité la dégradation de l'α-synucléine par le lysosome. Tirée de (Masliah et al., 2005b).*

2.1.3. Immunothérapie passive

Récemment, le même groupe a publié une étude d'immunothérapie passive avec un anticorps monoclonal (9E4) dirigé contre la partie C-terminale (Ct) de l'α-synucléine (Masliah et al., 2011). Ce domaine Ct qui semble jouer un rôle important dans le processus d'agrégation et d'oligomérisation de l'α-synucléine était déjà impliqué dans la vaccination (Masliah et al., 2005b). L'injection intrapéritonéale de 9E4 à 10mg/kg pendant 6 mois réduit l'accumulation de l'α-synucléine et prévient les déficits mnésiques observés avec le test de la piscine de Morris. L'α-synucléine, comme dans les travaux de vaccination, est colocalisée avec la cathepsine D et LC3, un marqueur de l'autophagosome, chez les souris injectées avec 9E4. Ces résultats confirment l'hypothèse émise dans leur précédente étude suggérant une dégradation par l'autophagie. A la *2ème conférence internationale des maladies neurodégénératives : Immunothérapie et biomarqueurs* qui s'est tenue à Uppsala les 26-27 mai 2011, Eliezer Masliah, a également rapporté les effets d'un nouvel anticorps, nommé 274. Cet anticorps n'a aucun effet sur l'accumulation de l'α-synucléine au sein des neurones mais plutôt au niveau des astrocytes. 274 agirait en activant de manière spécifique la glie, mettant en évidence, un nouveau mécanisme d'action. Cet Ac est particulièrement intéressant pour le traitement de l'atrophie multisystémique, une maladie caractérisée par l'accumulation de l'α-synucléine dans les cellules gliales.

Martin Ingelsson, a généré un anticorps dirigé contre les oligomères d'α-synucléine, 49G, suggérant qu'un traitement précoce avec cet anticorps pourrait ralentir ou stopper le processus de la maladie. En effet, il semble que l'anticorps ayant pénétré dans les cellules réduirait l'agrégation de l'α-synucléine (Uppsala: Immunotherapy—Not Just for AD Anymore - disponible à http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=2834).

Une étude de Papachroni a montré que des autoanticorps contre l'α-synucléine étaient présents dans 31% des sera de patients sains (Papachroni et al., 2007). Une approche utilisant

les immunoglobulines humaines (IVIg), en essai clinique de phase 3 dans la MA, est donc également envisageable pour traiter la maladie de Parkinson et autre synucléopathie. Une récente étude menée sur trois préparations commerciales d'immunoglobulines a révélé la présence d'anticorps dirigés contre les formes solubles d'α-synucléine sans démontrer d'effet sur la formation d'oligomères (Patrias et al., 2010). Toutefois, une étude longitudinale a été menée chez quatre patients atteints de la maladie à corps de Lewy traités par IVIg (Shankle et al., 2009). Les patients, traités avec 0,2 g/kg toutes les 2 semaines pendant 7-36 mois, ont été évalués par le test FAST. Les effets sur deux des trois patients sont encourageants alors que les effets sur le dernier patient sont plus décevants. Aucun effet défavorable important n'a été trouvé lors de ce traitement à long terme. Ces résultats ont été confirmés récemment à la conférence de l'ICAD 2011 (Hara et al., 2011).

2.1.4. Immunothérapie adoptive

D'autres équipes se sont tournées vers l'implication du système immunitaire et de l'inflammation dans la pathologie et ont préféré une approche d'immunothérapie adoptive. En 2004, Benner et ses collaborateurs ont démontré que le transfert de splénocytes provenant de souris immunisées avec Cop-1 (un copolymère stimulateur de T_H2) chez un modèle de souris Parkinson MPTP (1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine) protège les neurones dopaminergiques et réduit la réaction microgliale (Benner et al., 2004). Cette neuroprotection peut être attribuée à l'activation des cellules T et la sécrétion de cytokines de type T_H2 comme l'IL-4 ainsi que de facteurs neurotrophiques tel que le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*). Il semblerait que la neuroprotection induite par le transfert adoptif de cellules immunitaires spécifiques de Cop-1 soit essentiellement du aux lymphocytes T CD4+ (Laurie et al., 2007). Récemment le même groupe (Reynolds et al., 2010) a montré que les cellules Trégulatrices (T_{REG}) atténuaient la neuroinflammation induite par la réponse T_H17 générée par la vaccination avec l'α-synucléine nitrée (Benner et al., 2008).

En résumé, l'ensemble de ces résultats montre que l'immunothérapie est un concept applicable aux maladies neurodégénératives caractérisées par des agrégats intracellulaires *a priori* difficilement accessibles. Aussi, il semblerait que l'action des anticorps soit assez limitée et que d'autres stratégies immunothérapeutiques reposant sur une réponse immunitaire de type T_H2 ou T_{REG} présentent un intérêt certain.

2.2 LA MALADIE DE HUNTINGTON

2.2.1. Généralités

La maladie de Huntington (MH) ou Chorée de Huntington est la maladie neurodégénérative d'origine génétique la plus fréquente. Elle est caractérisée par des troubles moteurs, un déclin cognitif et des désordres psychiatriques. Le diagnostic certain est fait sur la base des signes caractéristiques de chorée, de dystonie, de bradykinésie, ou d'incoordination chez un individu à risque.

Il s'agit d'une maladie héréditaire causée par une expansion de triplet CAG au sein du gène codant pour la protéine huntingtine (Htg) (pour revue, Walker, 2007 ; Ross et Tabrizi, 2011). Les allèles normaux portent en règle générale moins de 30 répétitions du triplet ; un allèle devient pathologique au-delà de 36 répétitions. Cette mutation conduit à l'expansion de la séquence polyglutamine (polyQ) de la Htg (Hatters, 2008).

La MH est caractérisée par une dégénérescence progressive des neurones du striatum qui s'étend par la suite aux autres régions corticales. Au niveau microscopique, on peut observer des agrégats de Htg polyQ à l'intérieur des neurones (figure 12).

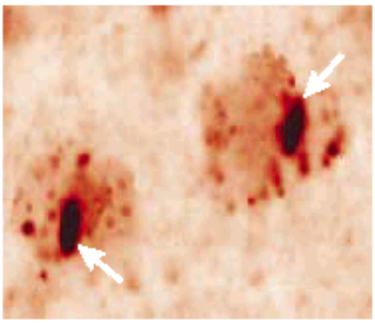


Figure 12. Aspect histologique des inclusions intraneuronales de Huntingtine

Les agrégats de Huntingtine poluQ à l'intérieur du noyau des neurones. Tirée de (Soto C, 2003).

2.1.1. Immunothérapie

Les études d'immunothérapie ciblant la Htg sont essentiellement des études d'immunothérapie passive utilisant des *intrabodies*. L'unique étude de vaccination publiée à ce jour a été menée par Miller et ses collaborateurs en 2003. Ces travaux ont montré qu'une

immunisation *via* un vecteur plasmidique réduisait le phénotype diabétique, un des marqueurs périphériques de la maladie (Miller et al., 2003).

A ce jour, peu d'études d'immunothérapie passive dans la maladie de Huntington *in vivo* ont été publiées (pour revue Southwell et Patterson, 2010). Les épitopes ciblés par ces *intrabodies* se situent tous au sein de l'exon 1 de la Htg mais il semblerait que les régions adjacentes au site de mutation soient plus prometteuses. En 2008, Wang et ses collaborateurs ont montré que EM48, un anticorps ciblant un épitope unique de la région Ct de la Htg, était capable de réduire les agrégats de Htg dans les neuropiles du striatum et d'améliorer les performances motrices des souris injectées (Wang et al., 2008). La réduction des agrégats de Htg pourrait résulter de la dégradation de la Htg mutante par la voie du protéasome. Une autre étude menée chez 5 modèles de souris Huntington différents a révélé que le transfert d'*intrabodie* améliore plusieurs aspects de la pathologie (Southwell et al., 2009). Happ1 dirigé contre la région riche en proline de la Htg est capable de réduire les agrégats de Htg mutante, la mort neuronale au niveau du striatum et d'améliorer les performances motrices dans différents modèles. Ces résultats indiquent que les *intrabodies* représentent un traitement très spécifique et efficace chez différents modèles de souris de la MH.

Les approches immunothérapeutiques sont encore peu étudiées pour cibler des agrégats protéiques intraneuronaux et qui plus est, situés à l'intérieur du noyau. Ce véritable challenge a permis l'émergence de nouvelles approches immunothérapeutiques comme l'utilisation d'*intrabodie*, approche désormais étudiée dans plusieurs autres protéinopathies.

La preuve de concept obtenue dans la maladie d'Alzheimer a permis d'étendre le champ d'application de l'immunothérapie aux maladies à prions et de manière plus surprenante à des maladies caractérisées par des agrégats intracellulaires telles que la maladie de Parkinson ou la maladie de Huntington. De manière générale, l'immunothérapie semble être une approche thérapeutique prometteuse pour traiter les protéinopathies neurodégénératives d'autant que plusieurs études suggèrent l'existence de mécanismes pathologiques communs à l'ensemble des ces affections. L'un des concepts émergents concerne la propagation des protéines selon un mode de nucléation assez proche de celui observé dans les maladies à prions (pour revues Lee S.J et al., 2011 ; Jucker et Walker, 2011).

Toutes ces évidences ont conduit à envisager l'immunothérapie contre la protéine Tau. En 1985, cette protéine a été identifiée comme le composant majeur des PHFs qui constituent les dégénérescences neurofibrillaires ou DNF de la maladie d'Alzheimer (Brion et al, 1985). Depuis, des agrégats de protéines Tau ont été rapportées dans plusieurs démences neurodégénératives qui sont maintenant regroupées sous le terme de « Tauopathies » et dont la plus connue est la maladie d'Alzheimer. Afin de développer une approche d'immunothérapie Tau la plus adaptée, il est nécessaire de connaître à la fois son rôle physiologique et son implication dans le processus pathologique. Ces deux aspects seront développés dans le chapitre suivant.

III. TAU ET TAUOPATHIES

1. LA PROTEINE TAU

La protéine Tau appartient à la famille de MAP (Microtubule Associated Protein). C'est en 1975 que Weingarten et ses collaborateurs ont purifié ces protéines et ont démontré leur association avec les microtubules (MT). Mais, c'est la mise en évidence des protéines Tau au sein des PHFs (Brion et al., 1985) qui a conduit de nombreuses équipes à étudier le métabolisme de ces protéines.

1.1 GENE ET EPISSAGE ALTERNATIF

Le gène *MAPT* se trouve sur le bras long du chromosome 17, en position 17q21 (Neve *et al.*, 1986). Ce gène est principalement exprimé dans les cellules neuronales mais également dans des tissus périphériques comme le cœur, les muscles, le pancréas et les testicules (Gu *et al.*, 1996). Le transcrit primaire subit un épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 (Andreadis *et al.*, 1992). Cet épissage alternatif tissu-spécifique, régulé par le stade de développement, génère dans le cerveau adulte six isoformes de Tau de combinaisons différentes suivant l'inclusion ou l'exclusion des exons alternatifs (figure 13) (Goedert et al., 1989a,b; Himmler, 1989).

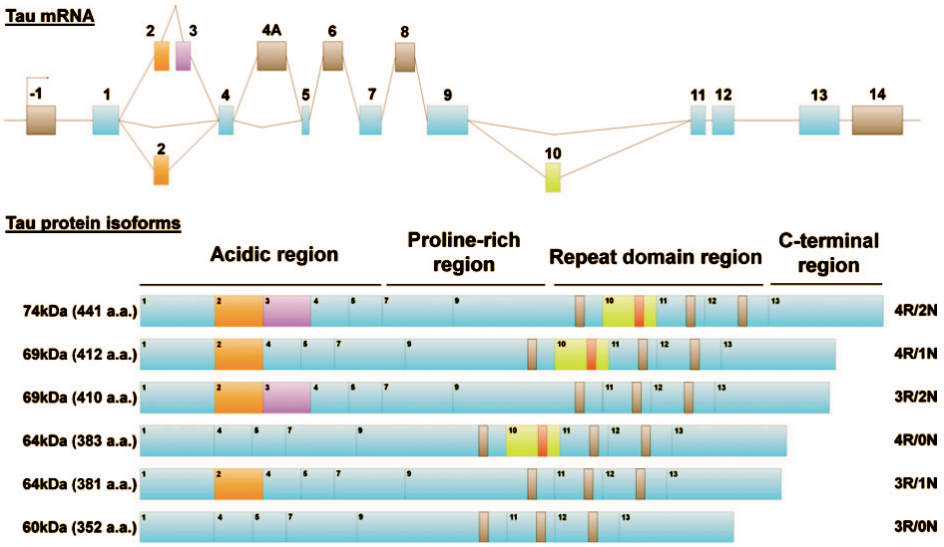


Figure 13. Représentation schématique du transcrit primaire de *tau* et des six isoformes du SNC adulte humain

Le gène tau est localisé sur le chromosome 17 et contient 16 exons donc 14 sont codants. Les exons 2 ,3 4a, 6, 8 et 10 sont alternatifs. Dans le cerveau adulte, seuls les exons 2, 3 et 10 sont exprimés. Tirée de (Martin L, 2011)

1.2 STRUCTURE ET MODIFICATIONS POST TRADUCTIONNELLES

1.2.1 Structure de la protéine Tau

Dans le cerveau adulte humain, la taille de la séquence des six isoformes protéiques de Tau varie de 352 à 441 acides aminés et leur masse moléculaire de 45 à 65 kDa (Buée et al., 2000). D'un point de vue structurel, la protéine Tau peut être divisée en 2 parties : le domaine de projection et le domaine de liaison aux microtubules (figure 14).

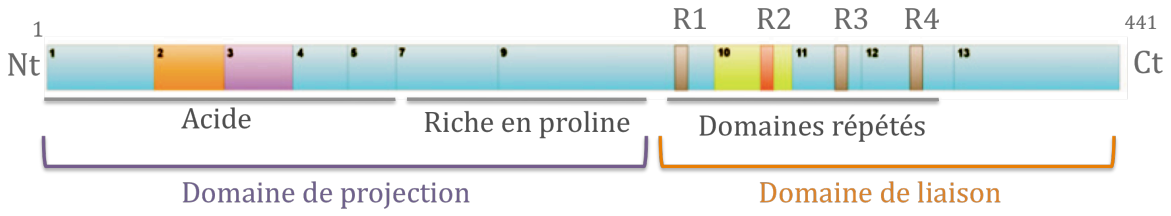


Figure 14. Structure de tau.

La protéine tau possède deux domaines fonctionnels majeurs. Le domaine amino-terminal est appelé domaine de projection. Le domaine carboxy-terminal contient les régions répétitives R1 à R4 et permet la liaison aux microtubules. Adaptée selon (Buée et al., 2000).

Le domaine Nt dont la taille varie suivant l'inclusion ou l'exclusion des exons 2 et 3 possède une région très acide et une région riche en proline. Ce domaine permettrait l'interaction de Tau avec d'autres éléments du cytosquelette et avec la membrane plasmique (Hirokawa et al., 1988; Brandt et al., 1995).

Le domaine Ct de Tau contient 3 ou 4 séquences de 18 acides aminés hautement homologues (R1 à R4) (Goedert et al., 1989a; Himmler, 1989). Les isoformes de Tau contenant 4 domaines de répétitions (4R) ont une plus grande affinité pour les microtubules et sont plus efficaces pour promouvoir leur assemblage que les isoformes Tau 3R (Butner and Kirschner, 1991; Goedert and Jakes, 1990; Gustke *et al.*,1994).

1.2.2 Phosphorylation

Parmi les différentes modifications post traductionnelles que subit la protéine Tau, la phosphorylation est, de loin, la plus fréquente. Il y a 85 sites potentiels de phosphorylation sur l'isoforme la plus longue de Tau (2N4R). La phosphorylation de Tau régule notamment son affinité pour les microtubules. Elle est principalement régie par des kinases et des phosphatases, mais d'autres facteurs peuvent être également impliqués.

1.2.2.1 La phosphorylation par les kinases

Un total de plus de 20 protéines kinases peuvent phosphoryler les protéines Tau principalement sur des sites Sérine ou Thréonine situés en particulier, de part et d'autre des domaines de liaison aux MTs (pour revues Buée et al., 2000 ; Sergeant et al., 2008 ; Martin L, 2011). Parmi ces kinases, on peut citer la GSK3 (Glycogen Synthase Kinase) (Ishiguro et al., 1993) ou les cyclin-dependant kinase dont Cdk5 (Cyclin Dependent kinase) (Cruz et al., 2003 ; Noble et al., 2003). Ces kinases vont phosphoryler les sites sérine et thréonine de Tau. Les sites tyrosine pourront quant à eux être phosphorylés par, entre autres, des protéines de type tyrosine kinase de la famille Src, telles que la protéine Fyn (Lee et al., 2004; Derkinderen et al., 2005).

1.2.2.2 La déphosphorylation par les phosphatases

La régulation de la phosphorylation de Tau dépend également de l'action directe ou indirecte des phosphatases. Les phosphatases PP1, PP2A et PP2B, PP5 sont capables de

déphosphoryler Tau *in vitro* (Goedert et al., 1995; Kins et al., 2001; Sontag et al., 1996; Sontag et al., 1999 ; Gong et al., 2004). Dans le cerveau humain, l'activité des phosphatases PP2A, PP1, PP5 et PP2B compte respectivement pour ≈ 71%, ≈11%, 1≈0% et ≈7%, de l'activité phosphatase totale de Tau (Liu et al., 2005). L'inhibition de PP2A régule la phosphorylation de façon directe et également *via* son interaction avec la GSK3 (Qian et al., 2010).

1.2.2.3 Les autres acteurs de la phosphorylation

La phosphorylation de Tau peut être modulée indirectement par l'action de la peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase Pin1 (Lu et al., 1999; Zhou et al., 2000 ; Hamdane et al., 2006). De plus, certains stress cellulaires tels que le stress oxydant (Davis et al., 1997; Galas et al., 2006; Zambrano et al., 2004) ou le stress thermique (Planel et al., 2007 ; Sultan et al., 2011) sont connus pour moduler la phosphorylation de Tau. D'autres stress comme la privation de nourriture entraînent une hyperphosphorylation de Tau (Yanagisawa et al., 1999).

1.2.3 Autres modifications

Bien que la phosphorylation soit la principale modification post traductionnelle de Tau, elle subit également un certain nombre d'autres modifications dont les effets sont encore mal connus. La N-acétyl-glucosaminylation (*O*-GlcNac) serait, par exemple, un autre moyen de réguler l'interaction Tau-microtubules (Liu et al., 2009). Tau fait l'objet d'autres modifications post traductionnelles incluant la N-glycosylation, l'ubiquitinylation, l'acétylation, la sumoylation, l'oxydation, la nitration, la polyamination, et la protéolyse. En condition physiologique, la présence de ces modifications reste néanmoins limitée.

1.3 LOCALISATIONS ET FONCTIONS DE LA PROTEINE TAU

La protéine Tau est exprimée principalement au niveau des axones des neurones mais elle est également localisée au niveau des dendrites, des membranes plasmiques ou encore dans le noyau. Selon sa localisation subcellulaire, elle exerce différentes fonctions qui sont étroitement liées à son degré de phosphorylation (pour revue Morris et al., 2011).

1.3.1 Tau cytoplasmique

1.3.1.1 Tau et dynamique microtubulaire

Le cytosquelette est composé de 3 types de filaments : les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ce dernier est une structure cylindrique, dynamique dont la formation repose sur l'association d'hétérodimères de tubuline sous forme de structures appelées protofilaments. Dans le cerveau, les MTs constituent la charpente des neurones, ils sont présents majoritairement dans les axones mais également dans les dendrites. La protéine Tau en tant que MAP facilite la polymérisation des dimères de tubuline *via* son domaine de liaison aux MTs et favorise ainsi la stabilité du réseau microtubulaire (Weingarten et al., 1975 ; Drechsel et al., 1992). Cette capacité de liaison aux MTs est hautement régulée par la phosphorylation de Tau (Lindwall et Cole, 1984 ; Johnson, 2004). De manière générale, un état peu phosphorylé augmente l'affinité de Tau pour les MT alors que l'hyperphosphorylation semble diminuer cette affinité. En particulier, la phosphorylation sur certains sites tels que les motifs KXGS des domaines de répétitions (Trinczek et al., 1995) ou la thréonine 231 (Cho et Johnson, 2004) réduit fortement la liaison de Tau aux MTs.

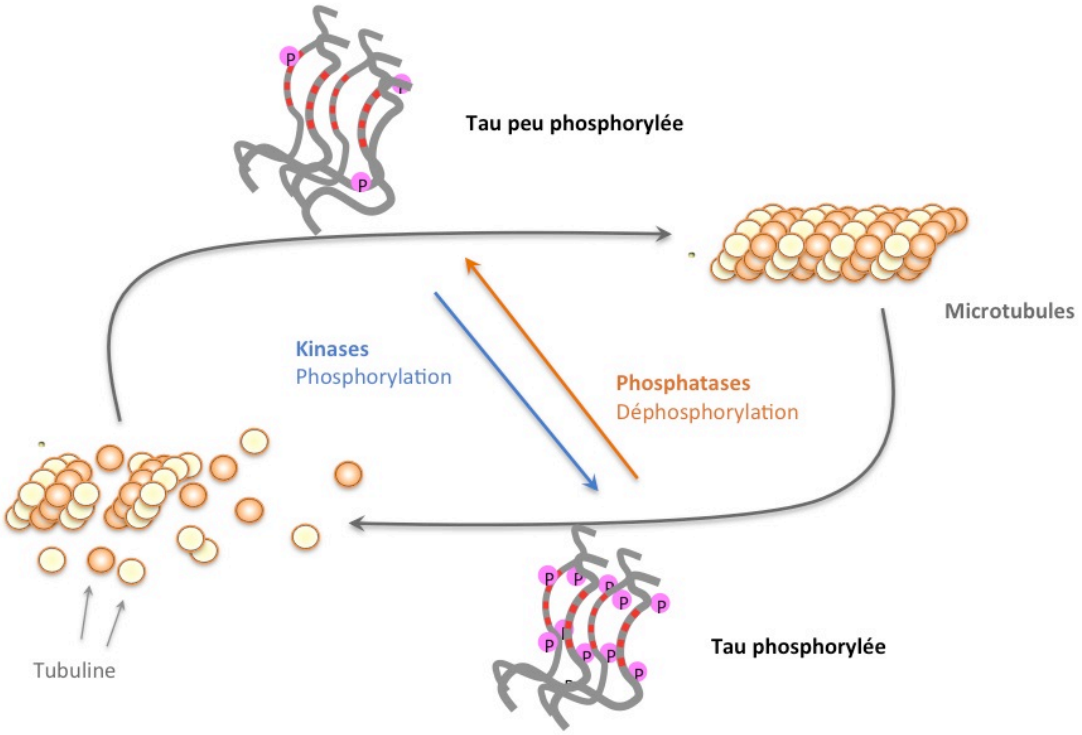


Figure 15. Phosphorylation de la protéine Tau et dynamique microtubulaire

Les formes phosphorylées de Tau présentent une capacité moindre à lier et stabiliser les microtubules. C'est l'équilibre entre phosphatases et kinases qui permet de réguler l'état de phosphorylation des protéines Tau et par là même la dynamique des microtubules nécessaire à des processus biologiques fondamentaux tel que le transport axonal. Adaptée de (Buée L, 2000)

1.3.1.2 Tau et transport axonal

Un neurone doit constamment fournir de nouvelles substances, protéines et membranes, à l'extrémité de l'axone et également dégrader les « vieilles » au niveau de son corps cellulaire. Ce transport s'effectue grâce à des moteurs moléculaires, appelés kinésine et dynéine, qui circulent le long des « rails » que constituent les microtubules. La kinésine assure le transport antérograde, du corps cellulaire à la terminaison axonale (Hirokawa et al., 1991), et le complexe dynéine/dynactine assurent le transport rétrograde, de la terminaison axonale au corps cellulaire (Paschal and Vallee, 1987). Les protéines Tau régulent le transport axonal en stabilisant les MTs et également en intervenant directement sur les moteurs moléculaires kinésine et dynéine (Ebneth et al., 1998 ; Cuchillo-Ibanez et al., 2008; Dixit et al., 2008 ; LaPointe et al., 2009).

1.3.1.3 Tau et polarité neuronale

Les neurones sont des cellules polarisées présentant un pôle somatodendritique et un pôle axonal. Cette polarité est possible grâce à l'organisation adéquate des microtubules. La stabilisation des microtubules par les protéines Tau, en collaboration avec d'autres protéines associées aux microtubules, est essentielle au développement des prolongements cellulaires et au maintien de la polarité neuronale (Caceres and Kosik, 1990; Harada et al., 1994).

1.3.2 Tau associée à la membrane

En plus de sa présence dans le cytosol, la protéine Tau interagit avec la membrane certainement *via* son domaine de projection (Brandt et al., 1995). Cette interaction a été confirmé dans plusieurs lignées cellulaires (Arrasate et al., 2000 ; Ekinci et al., 2000 ; Maas et al., 2000) ainsi que dans des neurones corticaux de rats (Pooler et Hanger, 2010). Cette interaction serait fortement liée à la phosphorylation de Tau. Les formes déphosphorylées notamment à l'épitope reconnu par Tau1 s'associent à la membrane plasmique contrairement aux protéines Tau phosphorylées aux sites PHF1 (Ser306/404) ou AT8 (Ser199/202 et Thr205). Bien que la fonction de Tau à la membrane plasmique ne soit pas encore clairement identifiée, plusieurs études rapportent l'existence d'une interaction entre Tau et les domaines SH3 des protéines tyrosine kinase de la famille Src, telles que la protéine Fyn, au niveau de la

membrane plasmique (Lee et al., 1998; Reynolds et al., 2008). Les récents travaux de Pooler (Pooler et Hanger, 2010) confirment le rôle de Fyn dans les mécanismes de trafic cellulaire de Tau. *Via* son interaction avec Fyn et d'autres protéines telles que PLC-γ Tau participerait à la signalisation cellulaire.

1.3.3 Tau nucléaire

Bien que moins décrite dans la littérature, la protéine Tau peut également être localisée au niveau du noyau des neurones (Brady et al., 1995). Une étude récente (Sjoberg et al., 2006) a mis en évidence la présence de Tau dans des régions particulières du nucléole, suggérant son implication dans l'organisation nucléolaire. Quelques études ont montré que la protéine Tau était capable, *in vitro*, de se lier à l'ADN et plus particulièrement au petit sillon (Wei et al., 2008). Ces travaux suggèrent l'implication de Tau dans la protection de l'ADN contre la dénaturation thermique (Hua et He, 2003), la dégradation de la DNAse ou encore les radicaux libres (Wei et al., 2008). Ce rôle protecteur a été confirmé récemment dans des cultures primaires de neurones soumises à un stress thermique ou oxydant (Sultan et al., 2011). La protéine Tau cytosolique soumise à ces stress subirait une déphosphorylation suivie d'une translocation nucléaire, lui permettant de jouer un rôle protecteur en se liant à l'ADN (Miao et al., 2010).

La protéine Tau a longtemps été présentée comme une protéine axonale dont la principale fonction était associée aux microtubules. Il s'agit en réalité d'une protéine bien plus complexe aux multiples rôles (pour revue Morris et al., 2011). Aujourd'hui étudier la physiologie de la protéine Tau est un enjeu majeur pour mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à sa pathologie.

2. LES TAUOPATHIES

2.1 CONCEPT DES TAUOPATHIES

Depuis son identification en 1985 comme étant le constituant majeur des PHFs dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau a été retrouvée dans plus de 20 maladies neurodégénératives (pour revues Buée et al., 2000 ; Lee et al., 2001 ; Sergeant et al., 2005).

L'ensemble de ces maladies regroupées sous le terme de Tauopathies possède une caractéristique commune : l'agrégation de la protéine Tau sous forme de filaments.

Bien que la présence de cette lésion soit commune à l'ensemble de ces affections elle n'est pas similaire d'une Tauopathie à l'autre. En effet, selon la maladie, les agrégats peuvent prendre des aspects histologiques différents (la DNF de la MA, les corps de Pick de la maladie de Pick, les touffes gliales de la paralysie supranucléaire progressive (PSP) ou encore les plaques gliales de la dégénérescence corticobasale (DCB)), et s'accumuler dans différents types cellulaires (neurones, astrocytes, oligodendrocytes) (figure 16).

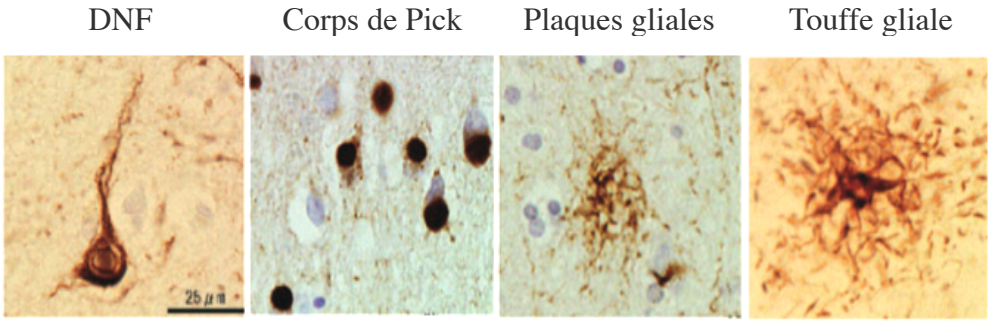


Figure 16. Différentes structures des agrégats de Tau.

De gauche à droite - Neurone en DNF observé dans la MA Corps de Pick observé dans la maladie de Pick Plaque astrocytaire observée dans la Paralysie Supra Nucléaire (PSP) et Touffe gliale observée dans la Démence Cortico Basale (DCB). Les différents agrégats de Tau sont marqués à l'aide d'un anticorps anti phospho-Tau (AT8 : pSer202/205). Tirée de (Hasegawa M., 2006)

Les Tauopathies se distinguent également d'un point de vue biochimique. Ainsi, la caractérisation du profil électrophorétique en SDS-PAGE des agrégats de protéines Tau a permis d'établir une classification des Tauopathies en 4 groupes (figure 17) (pour revue Sergeant et al., 2005).

• La classe 1 : agrégation des toutes les isoformes de Tau

La classe 1 est caractérisée par la présence de 3 bandes majeures à 60, 64 et 69 kDa et une bande mineure à 72/74 kDa. Ces bandes correspondent aux 6 isoformes de Tau (Hanger et al., 1992 ; Sergeant et al., 1997a, b). La bande à 60 kDa correspond à l'isoforme fœtale (0N3R) et la bande mineure à 72/74 kDa est constitué de l'isoforme la plus longue de Tau (2N4R) (Sergeant et al., 1997a). Ce profil biochimique est caractéristique d'une grande partie des Tauopathies et notamment de la MA (Buée et al., 2000).

• La classe 2 : agrégation des isoformes 4R de Tau

Le profil éléctrophorétique des Tauopathies de classe 2 est définit par un doublet à 64 et 69 kDa et la bande mineure à 74 kDa de l'isoforme 2N4R. Elle se caractérise par une augmentation du ratio des isoformes de Tau 4R/3R dans les agrégats de Tau. Dans ce groupe, on retrouve la PSP et la DCB, la démence à grains argyrophiles (DGA) ainsi que certaines démence fronto-temporale et parkinsonisme liée au chromosome 17 (DFTP-17).

• La classe 3 : agrégation des isoformes 3R de Tau

Cette classe est caractérisée par deux bandes majeures à 60 et 64 kDa correspondant essentiellement aux isoformes 3R. La maladie de Pick et certaines DFTP-17 appartiennent à cette classe (Sergeant et al., 1997b).

• La classe 4 : agrégation majoritaire de l'isoforme 0N3R

Cette classe correspond uniquement à la dystrophie myotonique de type I et II (DM1 et DM2) (Sergeant et al., 2001; Maurage et al., 2005). Le profil biochimique des protéines Tau pathologiques se caractérise par une bande majeure à 60 kDa, bien que des bandes mineures à 64 et 69 kDa peuvent être observées. Les agrégats de Tau sont majoritairement composés des isoformes excluant les exons 2 et 3 et partiellement l'exon 10 (Sergeant et al., 2001).

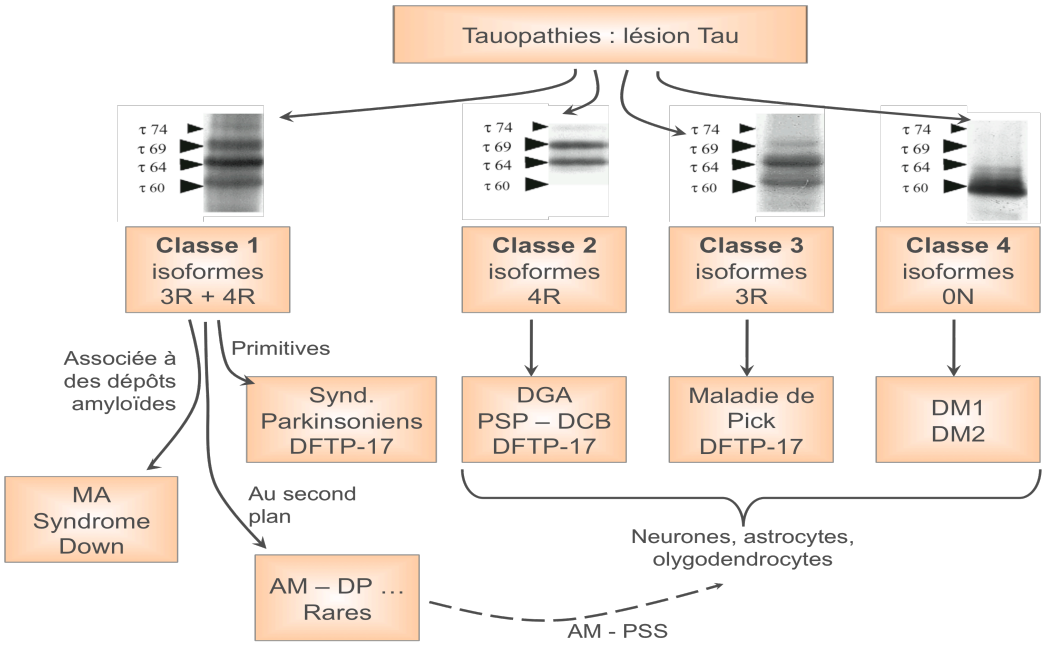
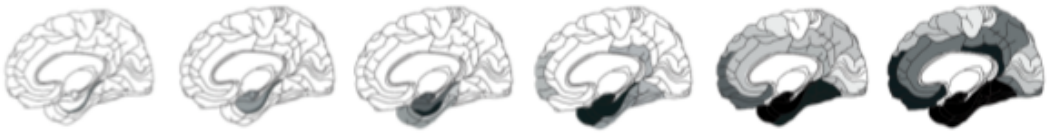


Figure 17. Classification des Tauopathies

AM : Atrophie Multisystèmique – DP : Démence Pugilistique – PSS : Panencéphalite sclérosante subaigue – DFPT-17 Démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 DGA : Démence à Grains Argirophiles – PSP : Paralysie SupraNucléaire – DCB : Démence Cortico Basale – DM1/DM2 : Dystrophie Myotonique

Toutefois, même si la composition et la localisation des agrégats de Tau varie selon la Tauopathie, la progression stéréotypée observée dans le cerveau de patients atteints de PSP (Verny et al., 1996), de DGA (Saito et al., 2004) et de MA (Braak and Braak, 1991) corrélée aux déficits cognitifs suggère un rôle majeur dans le processus pathologique. Cette corrélation a été notamment largement vérifiée dans la MA (figure 18) (Braak and Braak, 1991 ; Arriagada et al., 1992 ; Duyckaerts et al., 1997 ; Delacourte et al., 1999). La pathologie Tau progresse de façon stéréotypée en suivant des voies neuroanatomiques identiques pouvant refléter un caractère propagateur de la protéine Tau comme plusieurs études récentes le suggèrent (pour revues Frost et Diamond, 2010 ; Lee et al., 2011 ; Goedert et al., 2010 ; Jucker et Walker, 2011).



Distribution de la pathologie Tau au cours de la MA (Delacourte *et al.*, 1999)

Figure 18. Distribution de la pathologie Tau au cours de la MA.

Les premières lésions apparaissent au niveau de la région hippocampique, puis s'étendent à l'ensemble des régions corticales. Adaptée de (Delacourte et al., 1999)

D'autres Tauopathies comme la PSP (Verny et al., 1996) ou la DGA (Saito et al., 2004) présentent une progression stéréotypée de la pathologie Tau *via* d'autres voies neuroanatomiques et un phénotype différent (grains argyrophiles ou DNF dans des sous-populations neuronales différentes de la MA).

Récemment, la découverte de pré-tangles chez des patients d'une trentaine d'année (Braak et Del Tredici, 2011b) au niveau du locus coeruleus a renforcé l'hypothèse de la progression de la pathologie Tau dans la MA selon des voies neuroanatomiques. En effet, il est admis que les axones de cette région projettent jusqu'au cortex transentorhinal, la seconde région du cerveau touchée par la pathologie (figure 19).

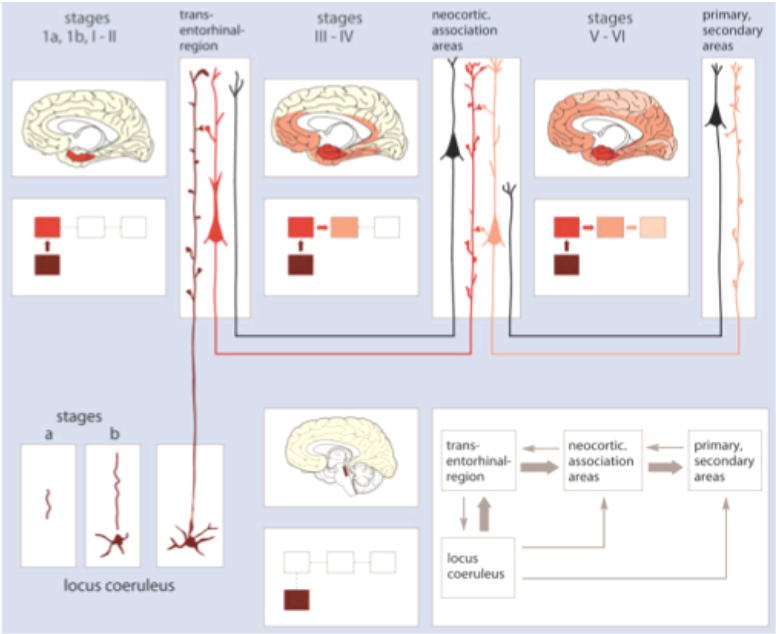


Figure 19. Schéma hypothétique de la progression de la pathologie Tau dans la MA.

Les premières lésions apparaîtraient au niveau du locus coeruleus, puis s'étendraient à la région trans-entorhinale et au cortex associatif via des connections synaptiques. Tirée de (Braak et Del Tredici, 2011a)

2.2 PROPAGATION

Le caractère propagateur de la protéine Tau a été démontré *in cellulo* et *in vivo*. En 2009, les expériences de Frost ont montré, d'une part, que des agrégats de Tau présents dans le milieu extracellulaire étaient internalisés dans les cellules neuronales et induisaient une agrégation de la protéine Tau intracellulaire et, d'autre part, que ces agrégats étaient transférés d'une cellule à une autre (Frost et al., 2009). La conversion de la protéine Tau soluble par des agrégats de Tau a été récemment confirmée par deux autres équipes (Nonaka et al., 2010 ; Guo et Lee, 2011). Les travaux de Clavaguera et ses collaborateurs, menés *in vivo*, ont renforcé l'hypothèse du caractère propagateur de la protéine Tau. En effet, l'injection de protéines Tau agrégées chez des animaux transgéniques induit une conversion de la protéine Tau soluble murine en une forme anormale insoluble qui se propage du site d'injection à d'autres régions cérébrales (Clavaguera et al., 2009).

Ainsi le concept de propagation de la pathologie Tau ouvre la voie à des thérapeutiques nouvelles notamment l'immunothérapie. En effet, il est très probable que les protéines Tau se propagent *via* le milieu extracellulaire et soient de ce fait, plus accessibles aux anticorps.

Gardons néanmoins à l'esprit que les Tauopathies sont caractérisées par des agrégats de protéines Tau et l'étude des mécanismes conduisant à son agrégation est essentielle à la compréhension de la pathologie et au développement de stratégies thérapeutiques adaptées.

2.3 L'AGREGATION DE LA PROTEINE TAU

Les caractéristiques de l'agrégation de la protéine Tau ont été essentiellement décrites par des études *in vitro*. En solution, la protéine Tau est une molécule flexible, sans conformation particulière. Toutefois, des études ont pu démontrer que les séquences ^{275}VQJINK^{280} et ^{306}VQJVYK^{311}, respectivement situées dans le domaine de répétition R2 et R3, possédaient des propriétés pro-agrégatives (Arrasate et al., 1999 ; Von Bergen et al., 2000). La notion de caractère agrégatif de la protéine Tau a été renforcée par la découverte de certaines mutations présentes dans les DFTP-17 qui semblent également affecter la fibrillogénèse de Tau (Arrasate et al., 1999 ; Goedert et Spillantini., 2000). Plusieurs modifications post traductionnelles sont également susceptibles d'être mise en jeu dans le processus d'agrégation et particulièrement la phosphorylation, la troncation et plus récemment l'acétylation de la protéine Tau (pour revues Gendron et Petrucelli, 2009 ; Meraz-Ríos et al., 2010 ; Martin L, 2011)

2.3.1. Les mutations

La découverte de formes familiales de démences frontotemporales (DFTP-17) résultant de mutations sur le gène *MAPT* (Spillantini et Goedert, 1998) a permis de mieux comprendre comment les protéines Tau pouvaient participer au mécanisme d'agrégation. A ce jour, plus de 40 mutations comprenant des mutations non sens, des délétions, des mutations silencieuses et des mutations introniques ont été découvertes (http://www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations). Selon le type de mutation, on peut définir 2 groupes de FDTP-17. Ainsi, lorsque les mutations sont situées en dehors de l'exon 10 et des sites régulant son épissage (G272V, P301L, P301S, K280, V337M, R406W) les propriétés biochimiques de Tau sont modifiées conduisant à une baisse de l'affinité pour les MTs. Lorsque la mutation touche l'exon 10 (mutations faux sens de type P301L et N279K) ou ces sites d'épissage (mutations silencieuses L284L, N296N), on peut observer un défaut d'épissage de l'exon 10 et une modification du ratio 3R/4R. Les agrégats sont alors surtout constitués d'isoformes de type 4R, l'agrégation touche les neurones et les cellules gliales. Un

défaut d'épissage indirect de Tau, notamment une réduction de l'inclusion des exons 2, 3 et 10 a également été rapportée dans une classe particulièrement de Tauopathie : la classe 4 qui regroupe les dystrophies myotoniques de type 1 et 2 (Sergeant et al., 2001). L'ensemble de ces données indiquent qu'un déséquilibre entre les formes 3R et 4R de Tau peut conduire à la pathologie Tau.

Toutefois, chez les patients atteints de MA, le gène *MAPT* ne présente pas de mutation ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes dans l'agrégation.

2.3.2. La phosphorylation

Comme nous l'avons vu précédemment la phosphorylation joue un rôle central dans la physiologie de Tau mais également dans les mécanismes conduisant à son agrégation. Dans les Tauopathies, les protéines Tau sont retrouvées hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées (figure 20) (http://cnr.iop.kcl.ac.uk/hangerlab/tautable), (pour revues, Buée et al., 2000; Lee et al., 2001; Sergeant et al., 2005).

L'hyperphosphorylation consiste en la phosphorylation excessive de sites qui sont normalement phosphorylés en conditions physiologiques (Kopke et al., 1993; Ksiezak-Reding et al., 1992). Elle peut être visualisée grâce à des anticorps tels que les anticorps AT8 (Porzig et al., 2007) ou AD2 (Buée-Sherrer et al., 1996). Les sites uniquement phosphorylés en conditions pathologiques constituent la phosphorylation anormale. A l'exception de la Ser422, détectable par AP422 (Hasegawa et al., 1996) ou encore 988 (Bussière et al., 1999), tous sont des épitopes conformationnels. Ils peuvent être visualisés par un panel d'anticorps comme AT100 (ⓟThr212/214) (Hoffmann et al., 1997; Mailliot et al., 1998), , PHF-27 (ⓟThr231/ ⓟSer235) (Hoffmann et al., 1997) et TG-3 (ⓟT231) (Jicha et al., 1997b; Hamdane et al., 2003).

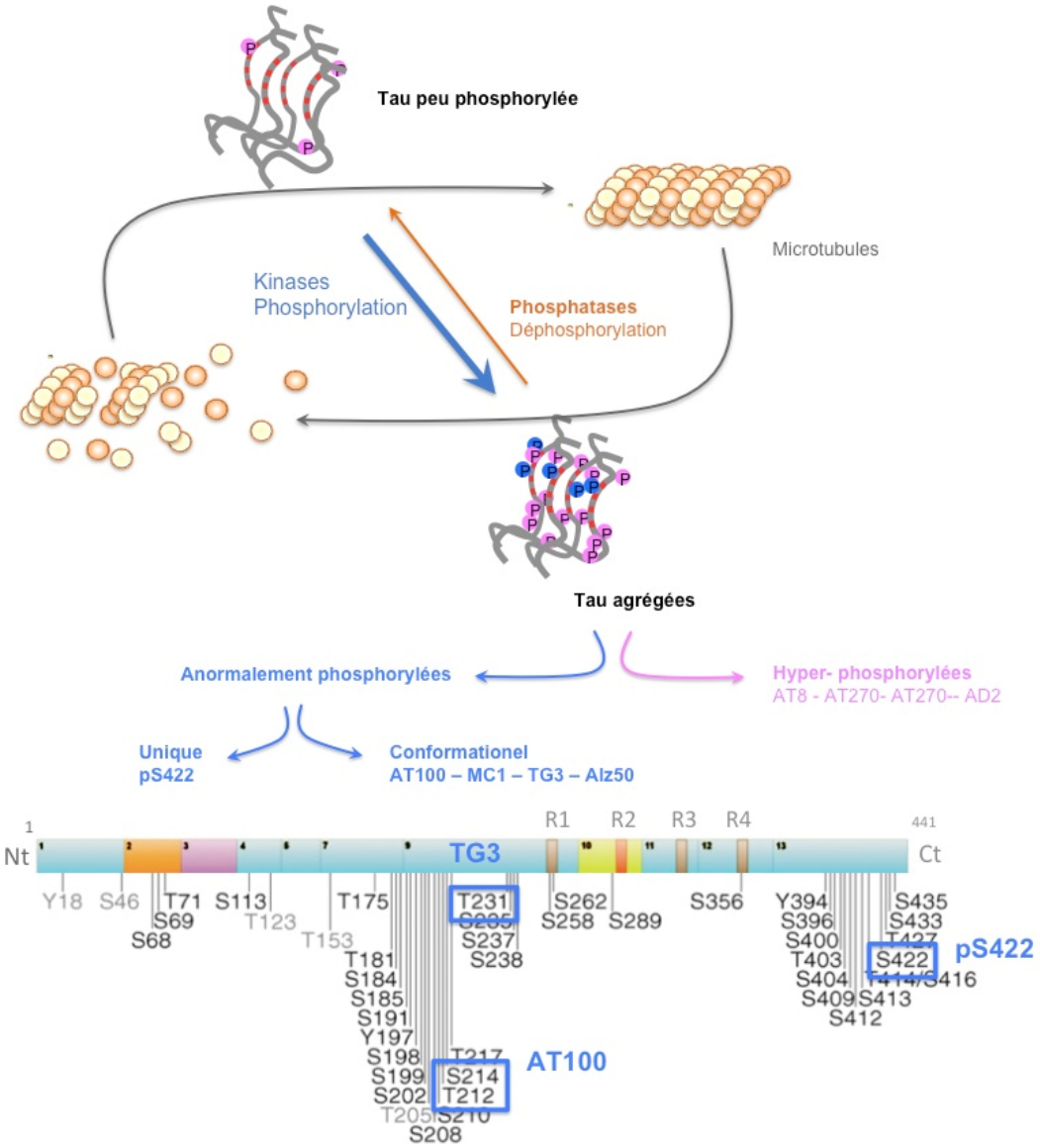


Figure 20. Phosphorylation pathologique de la protéine Tau

La phosphorylation est avant tout physiologique mais est également impliqué dans la pathologie Tau. Dans un neurone en DNF, il y a une hyperphosphorylation et/ou une phosphorylation anormale des 6 isoformes de Tau. Certains épitopes reconnus par exemple par les anticorps AT8 ou AD2/PHF1 sont davantage phosphorylé. Des épitopes nouveaux apparaissent, ils sont reconnus par exemple par les anticorps AT100, TG3 et pS422. Parmi ces sites de phosphorylation anormale seule la sérine 422 est un épitope unique non conformationel.

D'autres anticorps dépendants de la phosphorylation reconnaissent une structure conformationnelle plus générale de la protéine Tau agrégée; c'est le cas des anticorps MC1 et Alz-50 (Jicha et al., 1997a, b ; Carmel et al., 1996). Il est probable que cette phosphorylation joue un rôle majeur dans les processus qui conduisent à l'agrégation de la protéine Tau mais à quel niveau ?

La phosphorylation sur certains sites (Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356, Thr231), entraine une baisse de l'affinité de Tau pour les MTs (Brandt et al., 1994 ; Drewes et al., 1995 ; Liu et al., 2007 ; Alonso et al., 2010). Certaines études ont également montré que la pseudo phosphorylation dans la région Ct, notamment sur les Ser396/404 et la Ser422, conduisait à l'agrégation de Tau (Abraha et al., 2000 ; Haase et al., 2004 : Liu et al., 2007). L'effet toxique de l'hyperphosphorylation a également été mis en évidence dans plusieurs études (Fath et al., 2002 ; Steinhilb et al., 2007). De manière générale, l'hyperphosphorylation va conduire au détachement de la protéine Tau des MTs et par là même à une désorganisation du système microtubulaire (Alonso et al., 1994; Li et al., 2007), délétère à un transport axonal efficace (Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993) et favorable à une dégénérescence synaptique (Mandelkow et al., 2003). Comme nous l'avons vu précédemment, la phosphorylation de Tau implique beaucoup d'acteurs parmi lesquelles les kinases et phosphatases, les cibles privilégiées des thérapeutiques (cf. partie stratégies thérapeutiques). L'ensemble de ces données laisse supposer que l'hyperphosphorylation de Tau est une condition majeure pour son agrégation. Mais d'autres modifications post traductionnelles retrouvées sur les protéines Tau agrégées en filaments sont également mises en jeu.

2.3.3. Troncation

La troncation semble également impliquée dans les processus d'agrégation de la protéine Tau (pour revues Garcia-Serra et al. , 2008 ; Hanger et Wray, 2010). En effet, plusieurs études rapportent la présence de Tau tronquées en D13, E391 et D421 dans le cerveau de patients Alzheimer (Wischik et al., 1989 ; Novak et al., 1991 ; Novak et al. 1993 ; Basurto-Islas et al., 2008) ainsi que dans différentes Tauopathies (Guillozet-Bongaarts et al., 2007). Ces formes tronquées facilitent l'agrégation de Tau et contribuent à la mort neuronale (Chung et al., 2001 ; Gamblin et al., 2003 ; Rissman et al., 2004). Plusieurs études suggèrent que cette modification est un événement précoce dans la pathologie au même titre que la phosphorylation (Rissman et al., 2004 ; Mondragon-Rodriguez et al., 2008 ; DeCalignon et al., 2010). Les formes tronquées de Tau capables d'auto agrégation, seraient des agents de nucléation des formes entières de Tau (Wang et al., 2009 ; DeCalignon et al., 2010).

2.3.4. Autres modifications post traductionnelles

La glycosylation (Liu et al., 2002a, b), la O-glycosylation (Robertson et al., 2004), la glycation (Necula et Kuret, 2004 ; Kuhla et al.,2007) et la nitration (Horiguchi et al., 2003) sont également d'importantes modifications post traductionnelles impliquées dans l'agrégation de Tau. Récemment, l'acétylation est également apparue comme une modification post traductionnelle impliquée dans l'agrégation de Tau (Min et al., 2010 : Cohen et al., 2011).

L'ensemble de ces données confirme le rôle central de la protéine Tau dans la mise en place de la pathologie cependant la nature des espèces toxiques est sujet à débat. En effet, les agrégats longtemps considérés comme les espèces toxiques en raison de leur corrélation avec le déclin cognitif (Arriagada et al., 1992 ; Braak et Braak, 1991) sont de plus en plus décrits comme des structures inertes voire protectrices (pour revue Spires-Jones et al., 2011). De récentes études suggèrent que des espèces intermédiaires, plus particulièrement des espèces oligomèriques seraient à l'origine des pertes synaptiques et neuronales observées dans ces affections.

2.4 LES OLIGOMERES

L'idée que des espèces intermédiaires de Tau soient les espèces les plus toxiques et que les agrégats de Tau soient plutôt la finalité d'un processus de dégénérescence vient de plusieurs évidences. Tout d'abord, les neurones en DNF sont capables de survivre pendant plusieurs décennies (Morsch et al., 1999 ; Braak et Del Tredici, 2011a). D'une part, dans plusieurs modèles animaux de Tauopathies (Paquet et al., 2009 ; Yoshiyama et al., 2007) ainsi que chez des patients atteints de la MA (Gomez-Isla et al., 1997) les déficits neuronaux sont observés avant l'apparition des agrégats voire même sans la présence d'agrégats (Wittman et al., 2001 ; Andorfer et al., 2005). D'autre part, l'inhibition de la production de Tau est capable d'améliorer les déficits cognitifs sans pour autant réduire les agrégats, suggérant que des espèces intermédiaires seraient plus toxiques (Santacruz et al., 2005; Sydow et al . 2011). Plusieurs études suggèrent que de espèces oligomériques de Tau, présentes également chez l'homme (Maeda et al. , 2007 ; Sahara et al., 2008) seraient davantage corrélées avec la toxicité observée dans différents modèles de pathologie Tau (Berger et al., 2007 ; Meras-Rios

et al. 2009 ; Feuillette et al., 2010). *In vitro*, ces espèces intermédiaires de Tau sont capables de séquestrer d'autres MAP, déstabiliser les MTS et le transport axonal (Alonso et al., 1994). Plus récemment, le groupe de Kayes (Lassagna-Reeves et al., 2011) a confirmé le potentiel toxique de ces oligomères chez des souris sauvages.

Il est important de noter que ce concept de toxicité des oligomères n'est pas nouveau et a été largement exploré pour le peptide Aβ (pour revue Haas et Selkoe, 2007). Il semblerait, d'ailleurs, que ces espèces solubles intermédiaires soient impliquées dans un certain nombre de protéinopathies (Gadad et al., 2011).

2.5 STRATEGIES THERAPEUTIQUES

Les stratégies thérapeutiques pour les Tauopathies, à ce jour, visent à réduire l'hyperphosphorylation de Tau ainsi que son agrégation ou à augmenter sa dégradation. Enfin, certaines approches sont développées pour stabiliser les microtubules (pour revues Bariola et al., 2010 ; Noble et al., 2011).

2.5.1. Inhibition de l'hyperphosphorylation

Parmi les nombreuses kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau la GSK3 a été la plus étudiée. Plusieurs classes d'inhibiteurs ont été testés parmi lesquels le chlorure de lithium, les thiazoles, les thiadiazolidinones (TDZDs), les maleimides, les paillonnes ou encore les indirubines. Le chlorure de lithium, inhibiteur non spécifique de la GSK3, permet de réduire la phosphorylation de Tau et son agrégation *in vivo* (Perez et al., 2003 ; Noble et al., 2005). Il est actuellement en essai clinique de phase II, les premiers résultats indiquent une amélioration cognitive chez les patients traités (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01055392). Plus récemment, un nouvel inhibiteur de GSK3, le Tideglusib (NP-12) administré à des souris double transgénique, a permis de réduire la phosphorylation de Tau et les dépôts amyloïdes et d'améliorer les capacités cognitives des animaux (Serena et al., 2009). Ce composé est actuellement en essai clinique de phase II au même titre que l'acide valproïque. Des agents non sélectif comme le SRN-003-556 (Sérénade Pharmaceuticals) sont également capables de réduire la phosphorylation de Tau et améliorer les déficits moteurs chez des souris transgéniques (LeCorre et al., 2009).

Les phosphatases sont également impliquées dans la phosphorylation de Tau. Ainsi, augmenter l'activité de la PP2A en induisant sa déméthylation par le SIG-1012 a permis de réduire la phosphorylation de Tau chez des rats (Voronkov et al., 2011).

Considérée comme compétiteur de la phosphorylation au niveau de résidus sérines ou thréonines, la N-acétyl-glucosaminylation (O-GlcNac) serait un autre moyen de réguler l'interaction Tau-microtubules. Ainsi, un traitement avec du Thiamet-G, un inhibiteur sélectif de la *O*-GlcNAcase, a permis de réduire la phosphorylation de Tau dans des cultures cellulaires et chez des rats sauvages (Yuzwa et al., 2008).

2.5.2. Inhibition de l'agrégation

Bien que les agrégats ne soient plus considérés comme les plus toxiques, ils mènent, à terme, à une perturbation des fonctions physiologiques de la cellule notamment en séquestrant des protéines (Bölsche et al., 2011). Ainsi, plusieurs molécules ont la capacité *in vitro* de réduire l'agrégation de Tau parmi lesquelles les phénothiazines (Taniguchi et al., 2005), les rhodanines (Buick et al., 2007), les anthraquinones (Pickhardt et al., 2005) ou encore les aminothienopyridazines (ATPZs) (pour revue Buick et al., 2010). Le premier composé a être identifié fait parti de la classe des phénothiazines, il s'agit du bleu de méthylène (Wischik et al., 1996). Ce dernier connu sous le nom de Rember™ (TauRx) a reçu, par la suite, une large attention après les résultats de l'essai clinique de phase II revélant une amélioration cognitive chez les patients traités (Wischik et Staff, 2009). Récemment, O'Leary et ses collaborateurs ont montré que le bleu de méthylène était capable de réduire uniquement les formes solubles de Tau permettant ainsi d'améliorer les performances cognitives des souris transgéniques traitées (O'Leary et al., 2010). Au contraire, il est nécessaire de vérifier que ce type d'approche, en dissolvant les agrégats de Tau, n'induit pas le relargage d'espèces solubles potentiellement toxiques (Taniguchi et al., 2005).

2.5.3. Stabilisation des microtubules

La perte de fonction de la protéine Tau en tant que MAP participerait à la dégénérescence en conduisant à la dépolymérisation des MTs et par la même à un déficit dans le transport axonal. C'est cette hypothèse qui a conduit plusieurs équipes a étudié les effets de stabilisateurs de microtubules. Le Paclitaxel et d'autres dérivés du Taxol, utilisés à la base pour le traitement du cancer, ont permis de restaurer le transport axonal et d'améliorer les

performances motrices en augmentant la stabilité des MTs *in vivo* (Zhang et al., 2005). *In cellulo*, à une dose de 10nM, le Paclitaxel est capable de prévenir l'apparition de troubles liés à la surexpression de Tau tels que le transport axonal, la polarité neuronale ou encore l'accumulation de macro-autophagosomes et lysosomes (Shemesh et Spira, 2011). Toutefois, le Paclitaxel et la plupart des dérivés du taxol passent difficilement la barrière hémato-encéphalique, de nouveaux composés sont étudiés et semblent aussi efficaces (Brunnen et al., 2010a,b) Enfin, des signes de neuropathie périphérique ont été signalés à la suite de son utilisation dans le traitement du cancer (Lee et Swain, 2006) laissant perplexe quant à son utilisation dans la MA.

Un autre agent très prometteur, dérivé d'une protéine neuroprotectrice, est le peptide synthétique NAPVSIPQ (NAP). qui a la capacité de se lier à la tubuline (Divinski et al., 2006). Utilisé dans plusieurs modèles animaux, il a permis de réduire la pathologie Tau associée à la déstabilisation des microtubules (Matsusaka et al., 2007, 2008 ; Vulih-Shultzman et al., 2007) et d'améliorer les performances cognitives (Matsuoka et al., 2008 : Shiryaev et al., 2009). Le peptide, délivré en intranasal connu sous le nom de Davunetide (AL-108), a démontré son efficacité dans un essai clinique de phase II chez des patients atteints de la MA de stade modéré (Gozes et al., 2009). Une étude pilote a montré que le traitement au Davunetide est bien toléré chez les patients atteints de certaines Tauopathies (PSP, DCB, DFP-17) (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01056965) et une phase II / III a été lancé (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01110720).

2.5.4. Augmenter la dégradation et la clairance de Tau

Une autre approche pour réduire l'accumulation de Tau est d'augmenter la dégradation des protéines mal conformées. La première stratégie consiste à moduler l'activité de la protéine chaperonne Hsp90 qui est largement impliquée dans la dégradation de la protéine Tau *via* le protéasome et la voie lysosomiale médiée par les chaperonnes (pour revue Salminen et al., 2011). Ainsi plusieurs équipes ont montré l'efficacité de plusieurs inhibiteurs de l'Hps90 à réduire la protéine Tau phosphorylée *in vitro* (Dickey, 2006) et *in vivo* (Dickey et *al*. ,2007a, b ; Luo et al., 2007).

Une autre stratégie vise à augmenter la dégradation par la macro autophagie. En effet, plusieurs données de la littérature suggèrent une implication de la voie lysosomiale dans le dégradation de la protéine Tau (Hamano et al., 2008 ; Wang et al., 2009 ; Khurana et al.,

2010 ; Kim et al., 2011). L'utilisation de Trehalose, un inducteur de l'autophagie indépendant de mTor, a permis de réduire l'accumulation de protéines mal conformées incluant la protéine Tau (Casarejos et al., 2011 ; Rodriguez-Navarro et al., 2010).

2.5.5. Modification de l'épissage

Plusieurs données de la littérature suggèrent qu'un défaut d'épissage et particulièrement une augmentation des formes 4R pourrait contribuer à la pathologie (pour revue Zhou et al., 2008). L'utilisation d'oligonucléotides anti sens ciblant l'inclusion de l'exon 10 a permis de réduire l'expression des Tau 4R (Kilbus et al., 2001). Plus récemment, une nouvelle approche, appelée SMART™ (spliceosome-mediated RNA trans-splicing), reposant sur le ciblage des pré-ARNm a également permis de modifier le ratio 3R/4R (Rodriguez-Martin et al., 2005, 2009).

2.5.6. Immunothérapie

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'immunothérapie est une innovation thérapeutique qui porte beaucoup d'espoir pour le traitement des protéinopathies neurodégénératives comme la MA. Le premier essai de vaccination contre la protéine Tau (Rosenmann et al., 2006) a généré chez des souris sauvages des lésions caractéristiques des Tauopathies accompagnées de déficits cognitifs et d'encéphalomyélite. Cette étude a montré qu'une approche d'immunothérapie ciblant la protéine Tau physiologique était délétère et pouvait, comme les essais sur le peptide Aβ, générer une réponse auto-immune. A ce jour, on compte plusieurs études d'immunothérapie active contre différentes formes de la protéine Tau (tableau 4).

Tableau 4. Les essais de vaccination Tau.

IMMUNOGÈNE	MODÈLE	VOIE	ADJUVANT	DOSE	OBSERVATIONS	RÉFÉRENCE
Tau379-408 ℗Ser396/404	JNPL3	s.c	Alum	100μg	↘Tau (PHF1/MC1) + ↗STau + MA	Asuni et al., 2007
Tau260-264 ℗Ser262	JNPL3	-	Alum	-	↘ Tau (PHF1) + AM	Krishnamurthy et al., 2009*
℗Ser422	JNPL3	s.c	Alum	-	AM	Suzukake et al., 2011*
℗Tau Liposome	P301L	s.c	-	-	↘TauS - AM	Theunis et al., 2011*
Tau199-208 ℗Ser202/205 Tau209-217 ℗Thr212/ Ser214 Tau229-237 ℗Thr231/235	P301S Tg2576	i.p	Alum	100μg	P301S : Tau209-217 ↘ Tau AT8 Tau229-237 ↘ Tau AT8	Singer et al., 2011*
Tau379-408 ℗Ser396/404	hTau/PS1	s.c	Alum	100μg	↘ Tau PHF1 – AM/AC	Boutajangout et al., 2010
Tau195-213 ℗Ser202/205 + Tau207-220 ℗Thr212/ Ser214 + Tau224-238 ℗Thr231	Tau-DM-Tg	i.p	AF/Toxine pertussique	100μg	↘ Tau (Gallyas/AT8/AT180) + ↗Microglie – + ↘ Cathepsines D/L	Boimel et al., 2010
PHF-Tau	hTau		Alum	100μg	↘ Tau (CP13/RZ3) + ↘Tau CP13	Rader et al., 2011*
Tau tronquée	Rat Tg Tau	-	-	-	↘TauI + ↘TauS (℗+n℗Tau) + AC	Novak et al., 2009, 2010*

•Résumés Congrès – Rouge : immunohistomimie – Noir : Biochimie – Vert : Comportement
AF : Adjuvant de Freund – TauS : Tau Soluble – TauI : Tau Insoluble – AC : Amélioration Cognitive – AM : Amélioration motrice
PHF1 : ℗Ser396/404 / MC1 : aa7-9 et 313-322 / AT8 : ℗Ser202/205 / AT180: ℗Thr231 / CP13℗Ser202 / RZ3: ℗Thr231

La plupart de ces études utilisent des modèles murins transgéniques (JNPL3, P301S, P301L, Tg2576, DM-Tg-Tau) qui présentent souvent des déficits moteurs dus à la présence de la pathologie au niveau de la moelle (Lewis et al., 2000, Teruel et al., 2003). Ces modèles sont peu adaptés à une étude comportementale par des tests comme la piscine de Morris ou différents labyrinthes considérés comme particulièrement représentatifs du statut cognitif de l'animal. Néanmoins, des améliorations motrices ont pu être observées chez ces animaux suite à la vaccination (Krishnamurthy et al., 2009 ; Suzukake et al., 2011 ; Theunis et al., 2011). De nouveaux modèles plus appropriés tels que le modèle hTau/PS1 (Boutajangout et al., 2010) et tau (Hacker et Davies, 2011) ont été utilisés. Ces modèles sont d'autant plus intéressants que la lignée tau est la seule à ne pas utiliser de construction moléculaire avec une mutation sur l'ADNc de Tau. Elle exprime un mini-gène de tau humain dans une lignée invalidée pour la Tau murine (Andorfer et al., 2003; 2005). Ce modèle très séduisant, qui exprime les six isoformes de Tau, est cependant très instable et il est difficile d'avoir un nombre suffisant d'animaux pour réaliser des groupes homogènes.

A l 'exception du groupe de Fred Van Leuen qui étudie une vaccination basée sur l'utilisation de liposome (Theunis et al., 2011), l'ensemble des approches de vaccination utilise des adjuvants. Tous sauf le groupe de Rosenman ont pris le parti de l'adjuvant à base

de sels d'aluminium ou alum, connu pour induire une réponse de type T_H2. Néanmoins, même si le choix de l'adjuvant est important pour l'induction de la réponse immunitaire, les travaux du groupe de Rosenmann ont montré que le choix du peptide immunogène devait être davantage pris en considération (Rosenmann et al., 2006 ; Boimel et al., 2010). En effet, dans des conditions similaires (ACF + toxine pertussique) seule la vaccination contre la protéine Tau non phosphorylée (Rosenmann et al., 2006) conduit à une toxicité avérée. Or, la plupart des travaux de vaccination actuellement publiés portent sur des sites d'hyperphosphorylation (pSer396/404, pSer202/205) qui, nous l'avons vu précédemment, ne peuvent être considérés comme spécifiques de la pathologie. Il existe plusieurs sites de phosphorylation qualifiés de pathologiques. Tous sont des épitopes conformationels comme par exemple AT100 (pThr212/Ser214), TG3 (Thr231), MC1 (aa7-9/313-322) à l'exception de la pSer422. La Ser422 est un site pathologique unique particulièrement intéressant pour cibler la protéine Tau pathologique. En effet, la pS422 est retrouvée dans plusieurs Tauopathies (Bussière et al., 1999 ; Guillozet-Bongaarts et al., 2007) et plusieurs études suggèrent son implication dans la formation de la DNF (Hasegawa et al., 1996; Götz et al., 2001a,b; Ferrari et al., 2003; Pennanen and Götz, 2005 ; Deters et al., 2008, 2009). La phosphorylation en Ser422 semble être un évènement relativement précoce (Patterson et al., 2011). Toutefois, il semblerait également que la phosphorylation en Ser422 protège du clivage en aspartate 421 (Guillozet-Bongaarts et al., 2007), jouant ainsi un rôle protecteur vis à vis de la nucléation. Néanmoins, on peut imaginer que la présence d'anticorps au site pSer422 prévienne le clivage en D421. A l'heure actuelle, des résultats préliminaires d'une vaccination contre la pS422 dans le modèle JNPL3 ont été rapportées à l'ICAD 2011 (Suzukake et al., 2011).

De manière générale, l'ensemble des travaux de vaccination contre les différentes formes de la protéine Tau montre une réduction de la pathologie associée à une amélioration motrice et/ou cognitive. A l'exception des travaux de Boimel et ses collaborateurs, l'étude de la neurotoxicité potentiellement induite par la vaccination reste succincte, généralement limitée à l'analyse de l'astrogliose et de la microgliose. Les résultats encourageants des différentes approches de vaccination contre la protéine Tau ont conduit plusieurs groupes à étudier l'immunothérapie passive (tableau 5).

Tableau 5. Les études d'immunothérapie passive Tau en développement.

ANTICORPS	MODÈLE	VOIE	DOSE	OBSERVATIONS	RÉFÉRENCE
Ac PHF1 (ⓅSer396/404)	JNPL3	i.p	250μg[1]	↘Tau (PHF1) + TauI (PHF1/ CP13) + AM-AC	Boutajangout et al., 2011a
Ac PHF1 (ⓅSer396/404)	JNPL3	i.p	15mg/kg[3] 10mg/kg[2]	↘ Tau (PG5, AT8, nY29) + ↘ TauI (AT8)	Chai et al., 2011
Ac MC1 (conformationel)	P301S	i.p	15mg/kg[1]	↘ Tau (PG5, AT8, nY29) + ↘ TauI-S (AT8) + AM	Chai et al., 2011
Ac clone 2.10.3 (ⓅSer422)	TauPS2APP	i.p	20mg/kg[1]	↘ Tau + ↘ Tau	Bohrmann et al., 2011
TOMA (oligomères)	JNPL3	i.p	250μg[1]		Castillo et al., 2010*
Ac Tau5	JNP3L	i.c			Morgan et al., 2011*
Ac PHF1 (ⓅSer396/404)	hTau	i.p	250μg[1]	↘ Tau (RZ3) +↘ TauI (PHF1/ CP13)	Rader et al., 2011*
Ac MC1 (conformationel)	JNPL3	i.p	10mg/kg[1]	↘ Tau (CP13/RZ3) + ↘TauI (CP13/RZ3)	D'Abramo et al., 2011*
Ac DA31	JNPL3	i.p	10mg/kg[1]	↘TauCP13 /= TauRZ3 + =Tau CP13	D'Abramo et al., 2011*
Ac 4E6G7 (ⓅSer396/404)	hTau/PS1	i.p	250μg[1]	AM-AC	Boutajangout et al., 2011b*

* Résumés Congrès DOSE : [1] : 1 fois/semaine [2] : 2 fois/semaine [3] : 3 fois/semaine
i.p : intrapéritonéal – i.c : intracranial – TauS : Tau Soluble – TauI : Tau Insoluble – AC : Amélioration Cognitive – AM : Amélioration motrice
PHF1 : ⓅSer396/404 / MC1 : aa7-9 et 313-322 / AT8 : ⓅSer202/205 / PG5: ⓅS409 / nY29 : Y29 nitrée / CP13ⓅSer202 / DA31 : toutes les formes de TAU RZ3: ⓅThr231

A ce jour, seules deux études ont été publiées (Boutajangout et al., 2011 ; Chai et al., 2011) qui malgré des modèles animaux critiquables (JNPL3, P301S), montrent une réduction de la pathologie Tau associée à une amélioration motrice observée par le test du rotarod. Lors de l'ICAD 2011, d'autres groupes ont confirmé l'efficacité de l'immunothérapie passive à réduire la pathologie Tau (D'Abramo et al., 2011 ; Acket et al., 2011). En revanche, les effets de l'immunothérapie passive sur le déclin cognitif ne sont toujours pas clairement établis.

OBJECTIFS

L'objectif de ces travaux de thèse est d'étudier les effets de l'immunothérapie anti-Tau dans un modèle murin de pathologie Tau, le modèle THY-Tau22 (Schindowski et al., 2006).

Il existe plusieurs modèles murins de pathologie Tau caractérisés par une agrégation de Tau et l'apparition de DNF. La plupart sont basés sur des mutations du gène de Tau retrouvées dans les DFTP-17 (pour revues Denk et Wade-Martin, 2009 ; Buée et al., 2010), Parmi ces modèles on trouve notamment le modèle JNPL3 (Lewis et al., 2000) particulièrement utilisé dans les essais d'immunothérapie Tau qui présente comme nombre de modèles de pathologie Tau des déficits moteurs importants. En ce sens, le modèle THY-Tau22 développé au sein du laboratoire, exempt de pathologie motrice, est un modèle pertinent. Cette lignée surexprime l'isoforme de Tau humaine 1N4R présentant les mutations G272V et P301S retrouvées dans les DFTP-17 sous contrôle du promoteur neuronal THY1.2. Le modèle THY-Tau22 présente une accumulation progressive de protéines Tau principalement au niveau de l'hippocampe, de l'amygdale et dans une moindre mesure au niveau cortical. Les premières lésions apparaissent avant l'âge de trois mois au niveau du subiculum et de la région CA1 (Corne d'Ammon) puis s'étendent progressivement en direction de la région CA3 (figure 21). Les protéines Tau y sont hyperphosphorylées sur plusieurs sites reconnus notamment par AT8 (pSer202-Thr205), AT180 (pThr231-pSer235), PHF-1/AD2 (pSer396-404) et présentent une phosphorylation anormale sur les Thr212 et Ser214 (AT100) et la Ser422 (pS422) (figure 21).

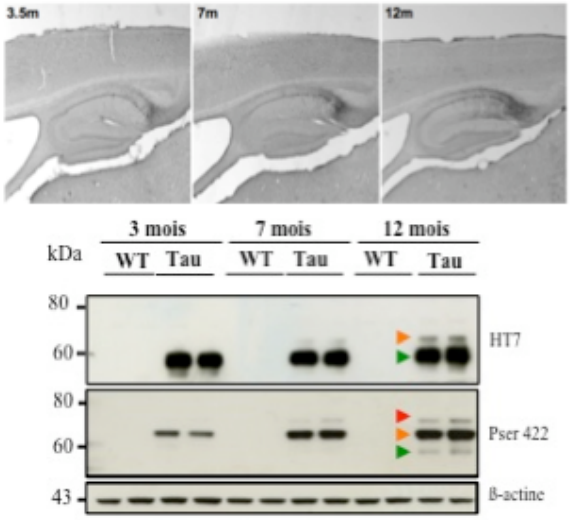


Figure 21. Progression de la pathologie Tau au cours de l'âge au sein de l'hippocampe de souris THY-Tau22.

Haut: La phosphorylation pathologique de Tau, visualisée grâce au marquage pS422,
Bas: La pathologie Tau hippocampique, visualisée par Western blot grâce au marquage pS422, est de plus en plus importante au cours de l'âge. HT7 correspond à l'expression du transgène. La β-actine est utilisée comme contrôle de charge.

L'accumulation de la protéine Tau est associée à des altérations progressives de l'apprentissage et de la mémoire spatiale dans différents tests comportementaux tels que le labyrinthe en Y, la piscine de Morris ou encore le test de la reconnaissance d'objets (Schindowski et al., 2006 ; Belarbi et al., 2011a, b ; Van der Jeugd et al., 2011).

Bien que ne présentant pas de pertes neuronales ni synaptiques majeures, les souris THY-Tau22 présente une altération de la LTD (Long Term Depression) hippocampique à l'âge de 9-10 mois et ce, en l'absence d'altération de la LTP (Long Term Potentialisation) (Van der Jeugd et al., 2011) (figure 22).

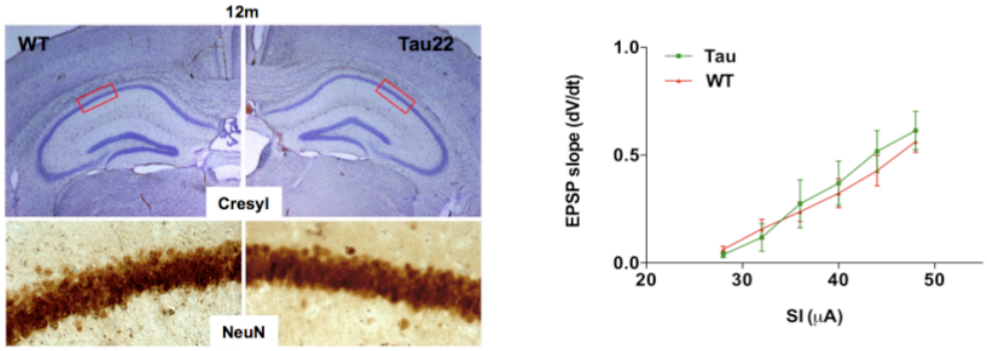
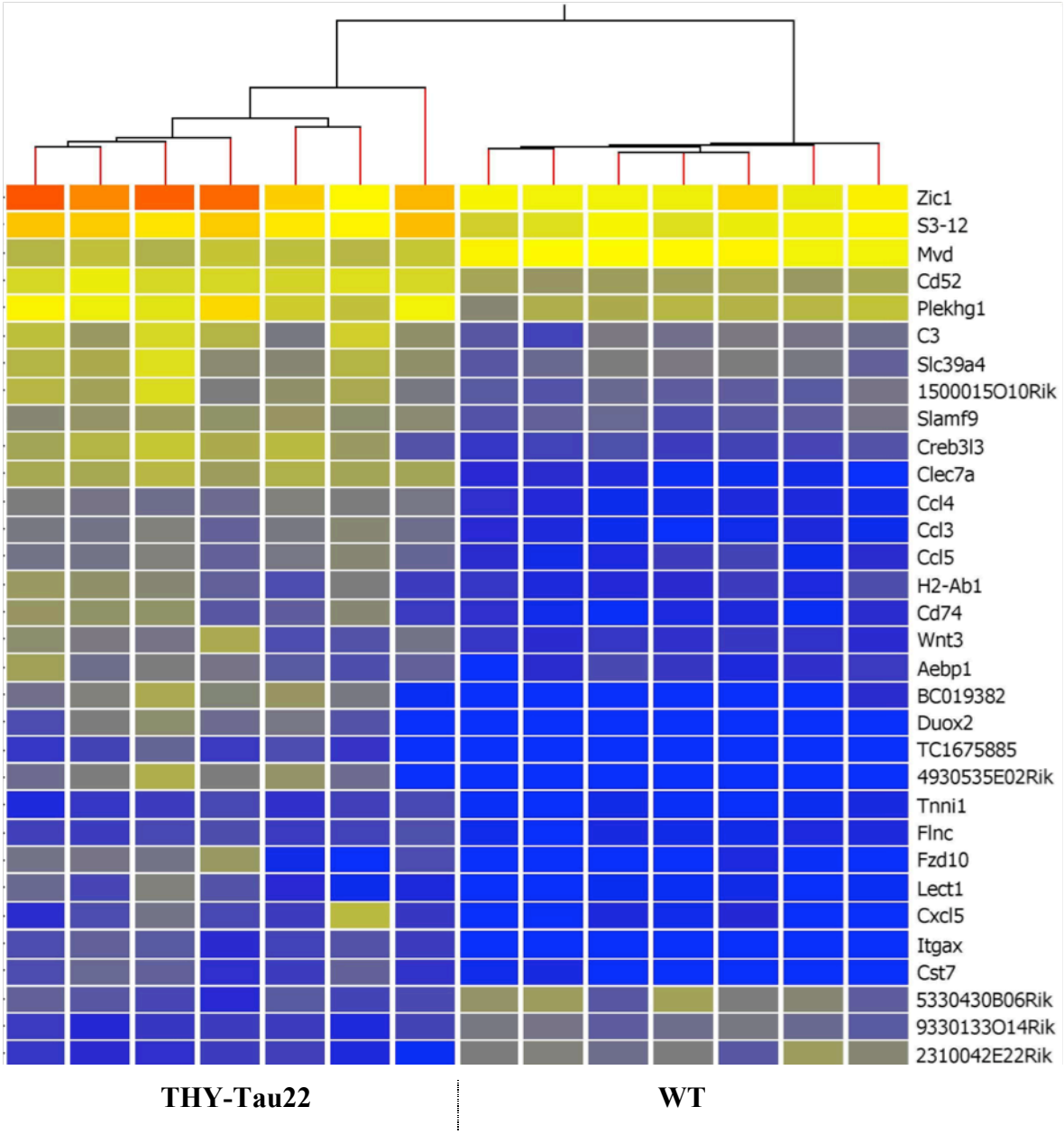


Figure 22. Absence de perte neuronale majeure dans l'hippocampe des souris THY-Tau22

Gauche haut : Coloration au crésyl violet de l'hippocampe de souris âgées de 12 mois, montrant l'absence d'altération majeure de la morphologie hippocampique chez les THY-Tau22 (droite). Gauche bas : Le marquage NeuN, représentant les noyaux des neurones de la couche CA1 de l'hippocampe, va également dans le sens d'une absence de perte neuronale majeure dans cette région chez les souris THY-Tau22. Droite : Courbe d'input/ouput chez des souris âgées de 10 mois, ne montrant pas d'altération de la transmission synaptique de base dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 (en rouge). Adaptée de (Belarbi et al., 2009)

Aussi, les souris THY-Tau22 âgées de 12 mois présentent une perte significative des neurones cholinergiques du septum médian et probablement une altération du transport rétrograde septohippocampique (Belarbi et al., 2009, 2011a).

Une analyse transcriptomique a également été réalisée dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 âgées de 12 mois et a révélé une régulation positive de plusieurs marqueurs pro-inflammatoires (CD52, C3, Clec7a, CCl4, CCL3, CCL5, H2Ab1, CD74...). Un certain nombre de ces marqueurs ont été validés par qPCR dans une étude au cours du temps (3, 7, 12 mois). En outre, d'autres marqueurs de l'inflammation tels que IL-1β et TNF (cytokines), CD45, CD68 (marqueurs de la microglie), GFAP (astrocytes) et CD3 (cellules T) ont été également étudiés par qPCR. Les résultats révèlent une surexpression de la plupart de ces marqueurs dans l'hippocampe. L'ensemble de ces résultats révèle la présence de phénomènes inflammatoires dans le modèle THY-Tau22.



Ainsi, le modèle THY-Tau22 présente une pathologie Tau bien caractérisée et séquentielle, avec une dérégulation de la phosphorylation de Tau et une agrégation de Tau sans perte neuronale massive. En outre, ces souris présentent des déficits cognitifs précoces en l'absence de déficits moteurs. Le modèle THY-Tau22 est un modèle pertinent pour l'étude de l'immunothérapie Tau.

La première partie de cette étude vise à établir les effets potentiels de la vaccination contre un épitope de phosphorylation pathologique de Tau (TaupS422). Dans un premier temps, nous avons établi un protocole vaccinal permettant de générer une réponse

immunitaire spécifique dirigé contre la protéine Tau pathologique. Ensuite, les effets de la vaccination sur la pathologie Tau et les déficits comportementaux associés ont été analysés.
Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication :

***Troquier L.*, Caillierez R., Burnouf S., Fernandez-Gomez F-J, Grosjean M.E, Zommer N., Sergeant N., Schraen-Maschke S., Blum D. & Buée L. Targeting phospho-Ser422 by active Tau immunotherapy in the THY-Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. 2011. Current Alzheimer Research (in press)**

Cette première étude nous a conduit à générer un anticorps monoclonal dirigé contre la sérine 422 phosphorylée : l'anticorps 2H9. Après avoir été caractérisé, cet anticorps 2H9 a été utilisé dans une deuxième étude d'immunothérapie anti-Tau s'appuyant sur un transfert passif d'anticorps. Les mécanismes d'action de l'immunothérapie dans la clairance de la protéine Tau ont également été étudiés.
Ce travail fait l'objet d'une publication (en préparation) :

***Troquier L*, Caillierez R., Zommer N., Kervoaze G., Lassalle P., Blum D. & Buée L. Passive Tau immunotherapy targeting phopsho-Ser422 reduces behavioral and pathological deficits in THY-Tau22 mouse model.**

RESULTATS

I. VACCINATION CONTRE LA PROTEINE TAU PS422 DANS LE MODELE THY-TAU22

1. OBJECTIFS

On définit les maladies neurodégénératives comme un ensemble d'affections dans lesquelles il existe une destruction lente et progressive de populations neuronales spécifiques. Une partie de ces maladies, regroupée sous le terme de protéinopathies, est caractérisée par l'agrégation et l'accumulation intra- ou extracellulaire de protéines mal conformées. Parmi les plus emblématiques, on peut citer la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Creutzfeldt Jacob ou encore la maladie de Huntington. Depuis quelques années, l'amélioration de la compréhension de la physiopathologie de ces protéinopathies et la mise au point de modèles animaux reproduisant la pathologie humaine ont permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques parmi lesquelles l'immunothérapie. Principalement envisager pour cibler les dépôts amyloïdes (pour revue Morgan D., 2011) les études d'immunothérapie portent aujourd'hui aussi sur la protéine Tau (pour revues Medina, 2011 ; Gu et Sigurdsson, 2011). Prenant en considération la nécessité de cibler uniquement les protéines Tau pathologiques afin d'éviter une réponse auto-immune délétère (Rose Mann et al., 2006) nous avons choisi d'étudier les effets de la vaccination ciblant la pSer422 dans le modèle THY-Tau22. En effet cet épitope non conformationel est un site de phosphorylation anormale, spécifique de la protéine Tau pathologique. La pSer422 est retrouvée dans plusieurs Tauopathies (Buissière et al., 1999 ; Augustinack et al., 2002 ; Guillozet-Bongaarts et al., 2007) et modèles animaux de pathologie Tau (pour revue Götz et al., 2010)) dont le modèle THY-Tau22 développé au laboratoire (Schindowski et al., 2006). La phosphoSer422 est un site particulièrement pertinent pour la MA. En effet, non seulement la phosphorylation en Ser422 est associée à la formation des agrégats chez l'homme (Buissière et al., 1999 ; Augustinack et al., 2002) et également dans certains modèles murins (Deters et al., 2008) mais elle est également influencée par Aβ (Penannen et Götz, 2005 ; Grueninger et al., 2010).

2. RESULTATS

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication et sont présentés dans l'article qui suit :

***Troquier L.*, Caillierez R., Burnouf S., Fernandez-Gomez F-J, Grosjean M.E, Zommer N., Sergeant N., Schraen-Maschke S., Blum D. & Buée L. Targeting phospho-Ser422 by active Tau immunotherapy in the THY-Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. 2011. Current Alzheimer Research (in press)**

3. CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons évalué les effets de la vaccination contre un épitope unique pathologique : la pSer422. Le premier objectif de cette immunisation active était d'obtenir une réponse spécifique vis à vis de ce site pathologique. Pour cela nous avons testé 2 peptides, de tailles différentes, couplés à une protéine porteuse, la KLH. Les 2 peptides diffèrent de 4 acides aminés qui rendent le peptide Y-14-T plus immunogène. Ainsi les titres en anticorps dirigés contre la Ser422 phosphorylée sont plus importants chez les souris vaccinées avec Y-14-T mais moins spécifiques vis-à-vis de la phosphorylation. L'étude de Rosenmann en 2006, ayant montré qu'une réponse immunitaire dirigée contre la protéine Tau non phosphorylée était délétère (Rosenmann et al., 2006), nous avons donc choisi d'étudier les effets de la vaccination avec le peptide Y-10-A plus spécifique. La vaccination a débuté chez des souris THY-Tau22 âgées de 15 semaines, avant l'apparition des déficits cognitifs. Après 18 semaines de vaccination, nous avons mis en évidence que les déficits de mémoire spatiale, observés grâce au test du labyrinthe en Y, étaient prévenus par la vaccination. Sur le plan neuropathologique, nous avons observé une large tendance à la réduction des protéines Tau phosphorylées en Ser422 et également aux sites reconnus par l'anticorps AT100 (pSer212/Thr214) au niveau de l'hippocampe. En effet, à cet âge, la pathologie Tau est très peu présente au niveau des autres structures à l'exception de l'amygdale. D'un point de vue biochimique, nous avons observé une baisse significative des espèces de Tau insolubles reconnus par les anticorps AT100 et pSer422. Contrairement aux observations d'Asuni et ses collaborateurs (Asuni et al., 2007), cette baisse ne s'accompagne pas d'une augmentation des espèces solubles. Enfin, de façon similaire à l'immunothérapie Aβ, nous observons une augmentation de la protéine Tau dans le plasma des souris vaccinées. Ces observations apportent une nouvelle hypothèse quant à la dégradation des protéines intracellulaires : l'effet siphon périphérique. Nos résultats bien que moins significatifs que ceux du groupe de Sigurdsson (Asuni et al., 2007 ; Krisnamurthy et al., 2009 ; Boutajangout et al., 2010,) confirment le réel potentiel de l'immunothérapie Tau dans le traitement de la MA et des autres Tauopathies.

II. IMMUNOTHERAPIE PASSIVE TAU PS422 DANS LE MODELE THY-TAU22 ET MECANISMES SOUS JACENTS

1. OBJECTIFS

La première partie de ces travaux de thèse, portant sur la vaccination, a confirmé le potentiel de l'immunothérapie pour le traitement des Tauopathies. Bien que les résultats de cette étude révèlent qu'il est possible d'obtenir une réponse spécifique contre la protéine Tau pathologique sans effets secondaires délétères. Une approche d'immunothérapie passive, bien que plus onéreuse, semble être une stratégie plus sûre. En effet, les anticorps sont capables d'agir plus rapidement et de façon plus spécifique que la vaccination. Il est également possible de contrôler la quantité d'anticorps administrée et d'avoir la possibilité d'interrompre rapidement le traitement si des effets secondaires sont observés. Récemment, deux études d'immunothérapie passive avec des anticorps conformationnels (PHF1, MC1) ont été rapportés (Boutajangout et al., 2011 ; Chai et al., 2011). Dans cette deuxième partie, nous avons étudié les effets de l'immunothérapie passive contre la protéine Tau pSer422 dans le modèle THY-Tau22. Pour ce faire, nous avons généré un anticorps monoclonal dirigé contre la pSer422 en immunisant des souris sauvages avec le peptide Y-14-T selon le même protocole de vaccination que la première étude. Cet anticorps 2H9 reconnaît de manière spécifique les protéines Tau pSer422 à la fois chez les patients atteins de la MA et chez les souris THY-Tau22. Ces travaux ont également eu pour objectif d'étudier les mécanismes potentiels de dégradation de la protéine Tau par les anticorps.

2. RESULTATS

Les résultats sont présentés sous forme d'un article en préparation

Passive Tau immunotherapy targeting phospho-Ser422 reduces behavioral and pathological deficits in THY-Tau22

Running title: Passive Tau Immunotherapy

Laëtitia Troquier[1,2], Raphaëlle Caillierez[1,2], Nadège Zommer[1,2], Gwenola Kervoaze[1,4,5], Philippe Lassalle[1,4,5], David Blum[1,2,3], Luc Buée[1,2,3]

1. Univ. Lille-Nord de France, UDSL, Faculté de Médecine, Lille, France
2. Inserm, UMR837, "Alzheimer & Tauopathies", Lille, France
3. CHRU-Lille, Jean-Pierre Aubert Research Centre, Lille, France
4. Institut Pasteur de Lille, Lille, France
5. Inserm, U1019, Lille, France

Corresponding author:

Luc BUEE, Inserm UMR837, Alzheimer & Tauopathies, Centre de Recherches Jean-Pierre Aubert,
Faculté de Médecine Pole Recherche, Place de Verdun, F-59045 Lille, France.
Email: luc.buee@inserm.fr

Introduction

Protein misfolded aggregates affect a number of different neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease, Parkinson's disease and others Tauopathies. Several studies have provided the hypothesis that protein aggregates spread in predictable sequences between anatomically related brain regions (for review Lee & al., 2011). Thus new approaches based on antibody therapies may act by blocking the « spread » of the pathological process. Vaccination of mice in experimental models of Tauopathy (Asuni & al., 2007 ; Boutajangout & al., 2010 ; Boimel & al., 2010) and Synucleinopathy (Masliah & al., 2005) has previously been reported to ameliorate pathology. Despite any adverse effect reported in these studies, passive immunotherapy may be preferred. Indeed, vaccination usually involves delivery of a strong adjuvant to boost antibody production and may induce an undesirable immune response as in the AN-1792 clinical trial (Orgogozo & al., 2003). Passive immunotherapy uses antibodies that are specific and then, safer than vaccination. Passive immunization has been shown to be effective in reducing Aβ (for review Jicha, 2009) and more recently intracellular protein like synuclein (Masliah & al., 2011) and Tau (Boutajangout & al., 2011 ; Chai & al., 2011). As for vaccination, the choice of the epitope of Tau to target is very important. Indeed, targeting non phosphorylated Tau has been shown to be deleterious (Rosenmann & al., 2006). Kayed's group has make the choice to target Tau oligomers witch seems to be the more toxic Tau species (Lasagna-Reeves et al., 2011). They injected monoclonal antibodies to Tau oligomers (TOMA) into the brain of two different models of Tauopathy and show a reduction of tau pathology. Injected intravenously TOMA rescued memory deficits of Tg2576 mice as revealed by a novel object recognition test and a single intravenous injection of 30 μg was able to reduce Tau oligomers detected biochemically and immunohistochemically. At the 2011 AD/PD meeting, Morgan and colleagues indicated that intracerebral injection of Tau-5, a monoclonal antibody against a non-phosphorylated epitope in the middle region of tau, effectively and acutely reduced intracellular tau pathology (Morgan et al. 2011). Further support for the passive approach came at the Alzheimer's Association International Conference, which took place 16-21 July 2011 in Paris. Sigurdsson's lab witch has recently published the first passive Tau immunotherapy with PHF1 antibody (Boutajangout et al., 2011a), also developed newer phospho-Tau specific antibodies. Among them, 4E6G7 reduced Tau pathology and rescued cognition in several behavioral tests (Boutajangout et al., 2011b). Cristina D'Abramo, injected two distinct Tau antibodies (DA31 and MC1) that recognize all forms of Tau and neurofibrillary tangles, respectively into P301L mouse model. Contrary to DA31, MC1 treatment can reduce the

development of Tau pathology in the P301L mouse (Cristina D'Abramo et al., 2011). We have previously shown that vaccination with a Tau fragment phosphorylated at Ser422 was effective at reducing Tau pathology and cognitive impairment in our THY-Tau22 mouse model.

In the present work, we determined in the THY-Tau22 mouse model if passive administration of a monoclonal Tau antibody directed against phospho-Ser422 (2H9), would have a therapeutic effect on Tau pathology and associated cognitive performance.

MATERIALS & METHODS

Animals

For this study, we have used heterozygous males THY-Tau22 and littermate wild type mice as controls (Schindowski & al., 2006 ; Belarbi & al., 2011 ; Van Der Jeugd & al., 2011). All animals were kept in standard animal cages under conventional laboratory conditions (12h/12h light-dark cycle, 22°C), with ad libitum access to food and water. All experiments on animals were performed in compliance with, and following the approval of the local Animal Resources Committee, standards for the care and use of laboratory animals and with French and European Community rules (Approval n° AF 06/2010, March 31, 2010).

Generation and characterization of monoclonal antibody 2H9

2H9 was prepared by immunizing C57Bl6 mice with phospho-peptide (NeoMPS, France) containing the epitope Ser422 phosphorylated (in bold) and three amino-acids Tyr-Gly-Gly conjugated to KLH emulsified in Freund's adjuvant:

Y14T [Tyr-Gly-Gly-**Ile-Asp-Met-Val-Asp-Ser(PO_3H_2)-Pro-Gln-Leu-Ala-Thr**]

Briefly, the lymphocytes from the spleen of the immunized mice were fused with myeloma cells, according to the method described in (Pandey, 2010). Firstly, the hybridoma supernatants were screened in ELISA as described in (Troquier et al., 2011). Then, the selected hybridomas were test by immunostochemistry and Western blot in both brain homogenates from AD patients and THY-Tau22 mice. The selected monoclonal antibodies were then produced, purified by protein G affinity chromatography (HiTrap Protein G HP) and controlled for endotoxin levels (2H9 < 0,15U/mg).

Passive immunization

THY Tau22 were injected intraperitoneally (i.p.) with 2H9 a monoclonal antibody IgG2a. Two different doses were tested: 5mg/kg (n=8) and 10 mg/kg (n=10). THY-Tau22 controls (n=11) were injected i.p. with phosphate buffered saline (PBS). Animals received their first injection at 3 months of age and then every week until behavioral testing at 8,5-9 months of age.

Stereotaxic injections

THY-Tau22 mice aged of 5 months were anesthetized with ketamine (10 mg/mL) and xylazine (1.5 mg/mL), and then positioned on a stereotaxic frame. Two injections were made with 1μL of monoclonal antibodies (AT8, AT100 (Innogenetics, Gent, Belgium) and 2H9) at 1μg/μL and/or the same volume of PBS buffer or isotype control into the hippocampus in the left and right hemispheres at a rate of 0.2 μL/min. After one week, mice were sacrificed and transcardially perfused sequentially with 0.9% NaCl and 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate-buffered saline (pH 7.4). Brains were postfixed for 2 days in 4% paraformaldehyde and then incubated in 20% sucrose for 24 hours and finally kept frozen at -80°C until use.

Behavioral testing

Y-Maze

Mice were tested for hippocampus-dependent spatial memory using a two-trial Y-maze task. The arms of the maze were 22cm long, 6.4cm wide and 15cm 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 cues were placed on the surrounding walls. Experiments were conducted with an ambient light level of 6 lux. During the exposure phase, mice were assigned to two arms (the "start arm" and the "other arm") that they were allowed to freely explore 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 1 min. The amount of time spent in each of the arms was recorded using EthovisionXT (Noldus, Netherlands).

Morris Water Maze

Spatial memory abilities were examined in the standard hidden-platform acquisition and retention version of the Morris water maze. A 100-cm circular pool was filled with water,

opacified with non-toxic white paint, and kept at 24±1 °C. Before the behavioral test, animals were submitted to a habituation phase, during which they were put on a 10-cm round submerged platform (1 cm below the water surface) and allow to explore the pool during 2 min. During the learning phase, animals were required to locate the submerged platform using only the spatial cues in the test room. The platform remained in the same quadrant throughout the task. Four positions around the edge of the tank were arbitrarily designated 1, 2, 3, and 4; thus dividing the tank into four quadrants. Each mouse was given four swimming trials per day (10 min interval) for five consecutive days. The start position (1, 2, 3, or 4) was pseudo-randomized across trials. Mice that failed to find the submerged platform within 2 min were guided to the platform, where they remained for 15 s before being returned to their cages. Time required to locate the hidden escape platform (escape latency) and distance traveled (path length) were recorded using a video tracking system.

Two days following the acquisition phase, a probe trial was conducted. During this probe trial (120 s), the platform was removed, search pattern of the mice was again tracked, and performance measures were calculated that included escape latency, path length, velocity.

Tau assays in blood samples from 2H9 injected mice

Tau concentrations in plasma (pg/ml) were determined at different times (6 hours; 24 hours and 1 week) following a single i.p injection using the INNOTEST® hTau Ag (Innogenetics, Belgium) that is a sandwich ELISA microplate assay for the quantitative determination of human Tau antigen in fluids. Capture antibody is the AT120 antibody and biotinylated antibodies HT7 and BT2 are detecting antibodies (Schraen-Maschke & al., 2008).

Immunohistochemistry

After the completion of behavioral experiments, animals were sacrificed and brains removed. The right hemisphere were post-fixed for 7 days in 4% paraformaldehyde, then incubated in 20% sucrose for 24 hours and finally kept frozen at -80°C until use. Serial free-floating coronal sections (40μm) were obtained using a cryostat (Leica Microsystems GmbH, Germany). Sections of interest were used for free floating immunohistochemistry using the following antibodies of AT8 (Pierce MN-120, against pS202/T205, 1/200), AT100 (Pierce MN-1060, against pT212/S214, 1/400), and anti-Tau pS422 (988, 1/1000) as described, and finally mounted on gelatine slides. Staining was semi-quantified as previously described (Belarbi et al, 2009). Photomicrographs were taken using a Leica digital camera, imported in ImageJ software (Scion) and converted to black and white images. Threshold intensity was set

and kept constant and the number of pixel, expressing staining density, was determined for both THY-Tau22 and immunized THY-Tau22- mice. Quantifications were performed blindly by at least two observers and averaged from seven to nigh animals per group.

Immunofluorescence

For stereotaxic injections, free-floating coronal sections (40μm) were obtained using a cryostat (Leica Microsystems GmbH, Germany). Immunofluorescent labeling was performed using the following primary antibodies: Lamp2 (Santa Cruz; 1:100) and NPC1 (Abcam; 1:250), biotinylated goat anti mouse IgG (Biosciences ; 1 :1000) and secondary antibodies coupled to Alexa 488 (Invitrogen) or Streptavidin Texas Red for biotinylated primary antibodies. Sections were counterstained and mounted with Vectashield/DAPI (Vector). DAPI was present in the Vectashield mounting medium for fluorescence (Vector). Slides were analyzed with a Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope (60 magnification). Images were collected in the z direction at 1-μm or 0,8-μm intervals.

Western blot analysis

Several structures of the left hemisphere were dissected out (Cortex, Striatum, Hippocampus and Cerebellum) using a coronal acrylic slicer (Delta Microscopies, France) at 4°C and stored at - 80°C until use. Tissue was homogenized in 200 µl of sucrose buffer containing 10-mM Tris-HCl pH 7.4, 10% sucrose and protease inhibitors (Complete, Roche, France) and sonicated. 100 µl of lysates were collected and added at 100μL of buffer B (10-mM Tris-HCl pH 7.4, 10% sucrose, 1M NaCl), sonicated and briefly centrifuged for 1 minute. The resulting supernatant (S1) was collected and the pellet resuspended in buffer C (10-mM Tris-HCl pH 7.4, 10% sucrose, 0,5M NaCl), sonicated and briefly centrifuged for 1 minute. The resulting supernatant was pooled with S1, 100 µl were collected and added at 100μL of sodium dodecyl sulfate (SDS) buffer (10-mM Tris-HCl pH 7.4, 1M NaCl, Triton 4%, SDS 0.2%) was added. The SDS homogenate was sonicated and spun at 100,000xg during 1h at 4°C. The remaining pellet containing the SDS-insoluble tau protein was resuspended in 50 μL of LDS 2X, sonicated and boiled 10 min at 100°C.

For Western Blot analysis, samples were diluted in NuPage sample buffer (Invitrogen) and denaturated at 100°C for 5 minutes. Then, proteins were loaded on 4-12% NuPAGE Novex gels (Invitrogen), and transferred to nitrocellulose membranes and incubated with appropriate antibodies. Signals were visualized by chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences). Membranes were incubated with the following antibodies: pSer212/pThr214 Tau (AT100, TS;

1/1000), pS422 (Biosource, 1/2000), home made Tau raised against carboxy-terminale region (1902, 1/10000) and GAPDH (Cell Signalling, 1/10000).

Statistics

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Data were analysed using analysis of variance (ANOVA), and where appropriate, followed by post-hoc Tukey's test. Differences of $p<0.05$ were considered significant. Data were analyzed and graphs were plotted by Prism Graphpad (San Diego, CA, USA).

RESULTS

Selection and characterization of novel monoclonal pS422 Tau antibody 2H9

By immunohistochemistry 2H9 labels only neurons of AD brain cortex but not control brain (Fig. 1A-B). In THY-Tau22 brain, 2H9 stain neurons of hippocampus and amygdala at the age of 6 months (Fig. 1C-D).

On western blot, 2H9 labeled the Tau triplet (Tau 55, 64 and 69) in AD total brain homogenates, while failing to recognize normal Tau proteins in brain homogenates from control case (Fig. 1E). In hippocampus homogenates from THY-Tau22 2H9 recognize also the hyperphosphorylated form of Tau that appears at 6 months of age and very stained at 12 months (Fig. 1E).

Passive immunotherapy and cognition. THY-Tau22 mice have strong deficits in learning and memory in several behavioral testing including the Morris water maze and the Y-Maze at 12 months of age (Van der Jeugd & al., 2011)

Y-Maze. Memory of immunized mice was first assessed using a two-trial Y-maze task. During the exposure phase, no differences were found in the distance moved and duration between the groups (Fig. 2A-B). During the test phase, WT littermate controls (n=8) and 5mg/kg THY-Tau22 mice (n=8) spent a significantly greater proportion of time in the novel arm compare to the other arm whereas controls THY-Tau22 mice (n=7) did not (Fig. 2C). THY-Tau22 injected with 10mg/kg of 2H9 spent also more time in the novel arm (n=9 ; p=0,11). In this test, the behavior of littermate controls was similar to that of immunized THY-Tau22 mice (Fig.2C).

Morris Water Maze. Following the two-trial Y-maze mice were tested in the water maze. During the training phase, all groups performed at comparable levels (Fig. 2D). Two days

after the training period, a probe test was performed. At 30 sec, control THY-Tau22 mice did not display a significant preference for the target quadrant compared with controls littermates (p = 0,0134) and 10mg/kg THY-Tau22 mice animals (p = 0.0216; Fig. 2E-F). Altought this difference was not significant for 5mg/kg THY-Tau22 they seems to spent more time in the target quadrant compare to the others (Fig. 2E-F).

Passive immunotherapy and Tau pathology. To assess the impact of Tau immunotherapy on the development of Tau pathology, we carried out an immunohistochemical analysis of abnormally phosphorylated (AT100; pSer212/pThr214; pSer422 ; MC1 conformational antibody provided by Peters Davies) Tau species. Passive tranfert significantly reduced the level of pathological Tau species at the targeted epitope pS422 (p=0,0447, 47% of reduction compare to controls) but have less effect on AT100 and MC1 staining (p=0,56 and p=0,3084 ; 26% and 23% reduction compare to controls, respectively) (figure 3A) Western blot analysis from hippocampus reveals decreased Phospho-Ser422- immunoreactive soluble Tau materials (31% and 27%, respectively, not significant). Analysis of insoluble Tau species and other phospho epitope are in progress (figure 3B).

Passive immunotherapy and Tau degradation

Tau concentrations in plasma was measured at different time point after a single i.p injection of 2H9 at 5mg/kg – 10mg/kg or PBS in THY-Tau22. After 6 hours, the level of Tau in plasma was similar between the groups (Fig 4A). After 24 hours, we observed a significant decrease of Tau concentrations in THY-Tau22 injected with 10mg/kg compare to control THY-Tau22 injected with PBS may be due to the inability for antibodies of ELISA to recognize the complex 2H9-Tau (Fig 4B). This result was totally reverse after one week as THY-Tau22 mice have significantly more plasmatic Tau compare to control mice (Fig 4C). Interestintly, at the samme time antibodies were totally cleared (Fig. 4F).

We have also injected pathological phospho Tau monoclonal antibodies (2H9, AT100) and phospho Tau antibody (AT8) into the hippocampus of THY-Tau22 mice. All these antibodies enter the neurons (Fig. 5A-C) contrary to isotype control (not show) but we found most neurons that have internalized AT8 (Fig. 5D). These neurons contain a large amount of AT8-immunorecative Tau and this antibody is more représentative of soluble Tau species (Fig 5E-F). To test the hypothesis that Tau is degradated *via* lysosomal pathways we performed a double-labeling with antibodies against Lamp2 (Fig. 5G), a lysosomal-associated membrane protein or NPC1 (Fig 5J), implicated in cholesterol trafficking from the lysosomes with

injected monoclonal antibodies. We found a partially co-localization for both markers (Fig 5I, L) suggesting an implication of the lysosomal pathway in Tau degradation.

DISCUSSION

Our previous findings indicate that vaccination with a phospho peptide including the pSer422 residue leads to a reduction of Tau pathology in the hippocampus of THY-Tau22. This decrease was observed by immunohistochemistry and by western blot for the insoluble Tau species (Troquier et al., 2011). Here we investigated the effect of a peripheral administration of a novel monoclonal antibody against pSer422 in the THY-Tau22 model. Recently several passive Tau immunotherapies have reported promising results (Boutajangout et al., 2011; Castillo et al., 2010; Morgan et al., 2011). 2H9 is a monoclonal antibody that recognizes Tau pSer422 in AD brain and in THY-Tau22 brain. This pathological phospho-epitope is found in multiple Tauopathies (Buissière et al., 1999 ; Augustinack et al., 2002 ; Guillozet-Bongaarts et al., 2007) and animals models (for review Götz et al., 2010). Phosphorylation of Ser422 increases aggregation propensity (Haase et al. , 2004) and correlates with tangle formation in P301L model (Deters et al., 2008) as in THY Tau22 model (Schindowski et al., 2006). Tau pSer422 is an early event that precede caspase cleavage (DeCalignon et al., 2010). Caspases cuts Tau at the aspartate residue at position 421 (Asp421), yielding a truncated Tau protein that has been suggested to be a nucleation agent. Then immunotherapy targeting pSer422 may prevent this cleavage. In the present study, i.p injections of an antibody raised against pS422 delayed cognitive deficits in the THY-Tau22 model as observed in the Y-Maze and the Morris Water Maze tests. Immunohistochemical analysis also revealed a reduction of abnormally phosphorylated Tau proteins in the hippocampus. Like in the recent study of passive immunization published by the group of Sigurdsson (Boutajangout et al., 2011a), the passive approach appears to be less efficacious than vaccination. One reason for less efficacy of these passive immunotherapy compared to our previous active approach is likely the affinity of our antibody. Another explanation is the permeability of the blood brain barrier that may be more compromise with the use of Freund's adjuvant and then, leads to a greater proportion of antibodies to enter the brain (Rabchevsky et al., 1999). Finally, the potential involvement of T cell in vaccination may be beneficial as suggested by some studies of immunotherapy in Parkinson's disease (Laurie et al., 2007) and in prion's disease (Carnaud and Bachy, 2010). Despite, no striking results we are convinced that immunotherapy targeting Tau pS422 has a great potential as treatment for Tauopathies. The preliminary results of a

recent passive tranfert in TauPS2APP triple transgenic mice with monoclonal antibody raised against pS422 confirms the potential of targeting this particular epitope (Bohrmann et al., 2011). In order to ameliorate vaccine it is necessary to understand the mechanisms of antibody-mediated clearance of Tau aggregates.

In our previous study of vaccination, we have observed an increase in plasmatic Tau concentrations of vaccinated mice suggesting a mechanism of "peripheral sink" like for Aβ immunotherapy (DeMattos et al., 2001; Lemere et al., 2003). After a single injection of 10 mg/kg of 2H9, we also observed an increase in Tau concentrations in plasma from THY-Tau22, it strongly suggests that circulating antibodies sequester Tau and favor efflux of Tau from the brain. This result is consistent with the reduction of soluble Tau species observed by western blot. It is also known that a small percentage of antibodies is able to cross the blood-brain barrier (Levites et al., 2006). Once in the brain, anti-Tau antibodies may easily recognize extracellular epitopes found in ghost tangles and trigger microglia-related clearance. However, they may also enter the cell through the endosome-lysosome pathway and activate mechanisms of Tau clearance as propose by several groups (Asuni et al., 2007; Krishnamurthy et al., 2011; Boimel et al., 2010). To elucidate this potential mechanism, phospho Tau antibodies were injected into the hippocampus of THY-Tau22 and have been internalized into neurons. Then, we have detected antibodies co-localized with lysosomal markers, Lamp2 and NPC1. Interestingly, some preliminary results, presented at ICAD 2011, reported that increasing brain *CYP46A1* gene expression, implicated in cholesterol metabolism, reduces hyperphosphotylated Tau content and improves spatial memory defects in THY-Tau22 mice (Cartier et al., 2011). This study and previous results showing that exercice in THY-Tau22 leads to a decreased in pathological Tau species associated with an upregulation of NPC1 (Belarbi et al., 2011b) suggest that Tau within the lipid rafts may be implicated in the process of aggregation. Indeed, lipids rafts are involved in cell-cell communication and particularly in the exosome release process and exocytosis (Gassart et al., 2003). It's possible that antibodies act in promoting the degradation of Tau associated with lipids rafts and then, blocking the propagation process of Tau.

In summary, these findings show that passive Tau pSer422 immunotherapy can reduces cognitive impairments. The aim of this study was also to elucidate the mechanisms of antibody-mediated clearance. Overall, like for Aβ immunotherapy, several mechanisms may be proposed. We suggested that the presence of circulating antibodies creates a « peripheral sink » which alters the equilibrium across the blood brain barrier for Tau to favour efflux owing to the reduced free Aß concentration in blood. The second hypothesis impliquates that

antibodies enter the SNC. Then, they may act directly on extracellular Tau and block the spread of Tau pathology (Frost et al., 2009 ; Clavaguera et al., 2010). These antibodies may also be internalized by the neurons by different processes (for review Sigurdsson, 2008) and activate the autophagic/lysosomal pathways.

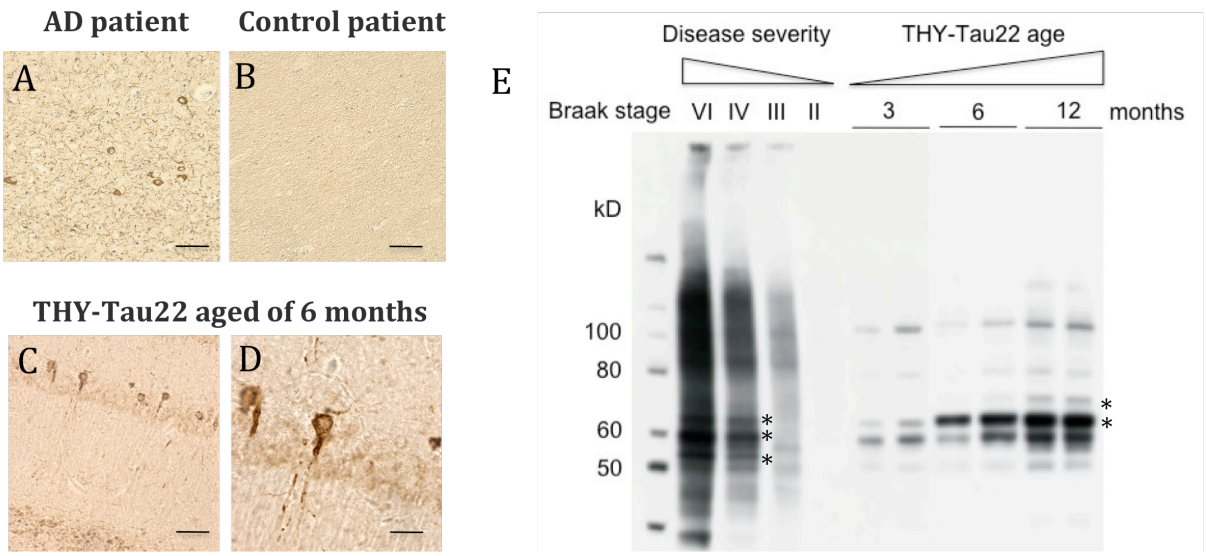


Figure 1. Immunochemical characterization of the specificity of 2H9 antibody utilized for passive immunotherapy

2H9 staining in the pyramidal cell layer of the CA1 region of a THY-Tau22 mice aged of 6 months (A-B) and in the occipital cortex of an Alzheimer patients. No staining was observed in the occipital cortex of a control patients.

Western blot analysis was performed with total fraction from the occipital cortex of AD patients at different Braak stage and hippocampus of THY-Tau22 (E). 2H9 labeled the Tau triplet (Tau 55, 64 and 69) in AD patients while failing to recognize normal Tau proteins in brain homogenates from control case. In hippocampus homogenates from THY-Tau22 2H9 recognize also the hyperphosphorylated form of Tau that appears at 6 months of age and very stained at 12 months

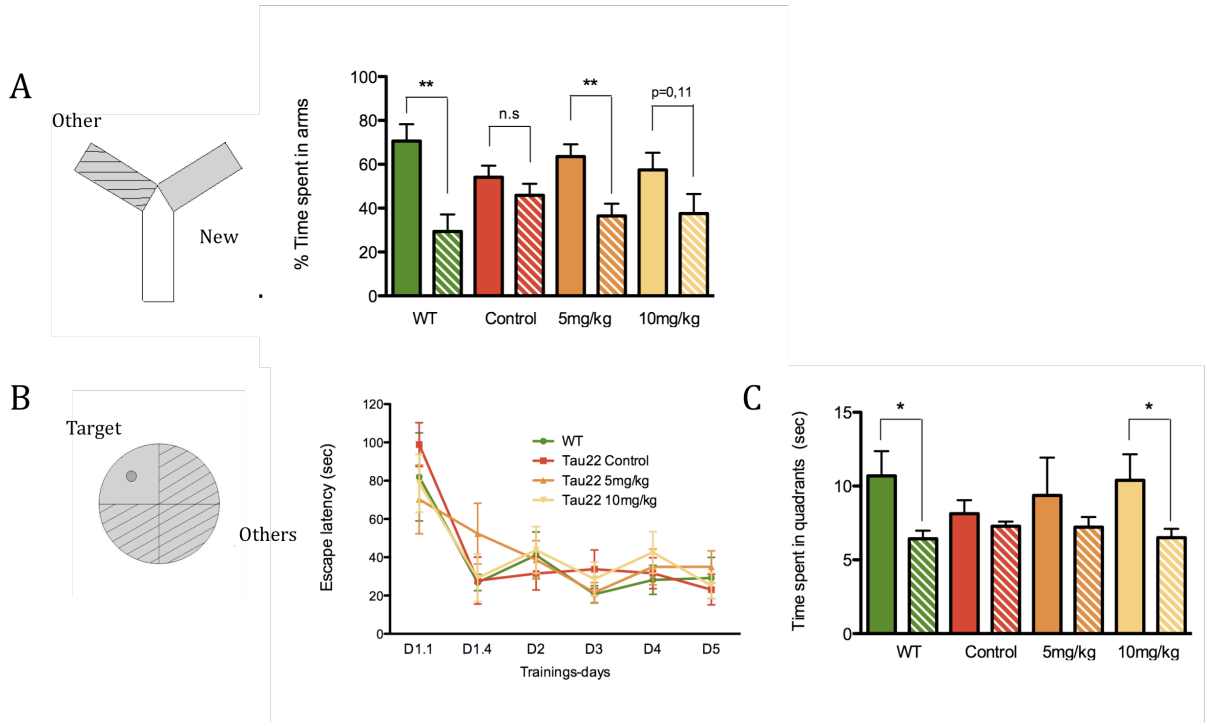


Figure 2. Effects of passive immunization on behavioral performance in the Y-Maze and in the Morris Water Maze in THY-Tau22 mice.

Working memory in the Y-maze. A**.** During exposure, WT and THY-Tau22 mice equally explored the arms (not shown). In the test phase, WT mice demonstrated a strong preference for the novel arm as compared to the other. arm. This preference was strongly reduced in THY-Tau22 mice. Such defect is prevented by passive immunotherapy as THY-Tau22 mice treated with 5mg/kg and 10mg/kg of 2H9 spent more time in the novel arm compare to the other ($p<0,01$ and $p=0,11$, respectively).

Spatial memory in the Morris water maze. B. Distance to platform of THY-Tau22and WT mice during acquisition is similar between the groups. C. Two days after acquisition, a probe trial was performed. Total time in the quadrants is plotted. While WT mice spent significantly more time in the platform quadrant, THY-Tau22 control mice did not. However, THY-Tau22 mice injected with 2H9 at 10mg/kg spent significantly more time in the target quadrant.

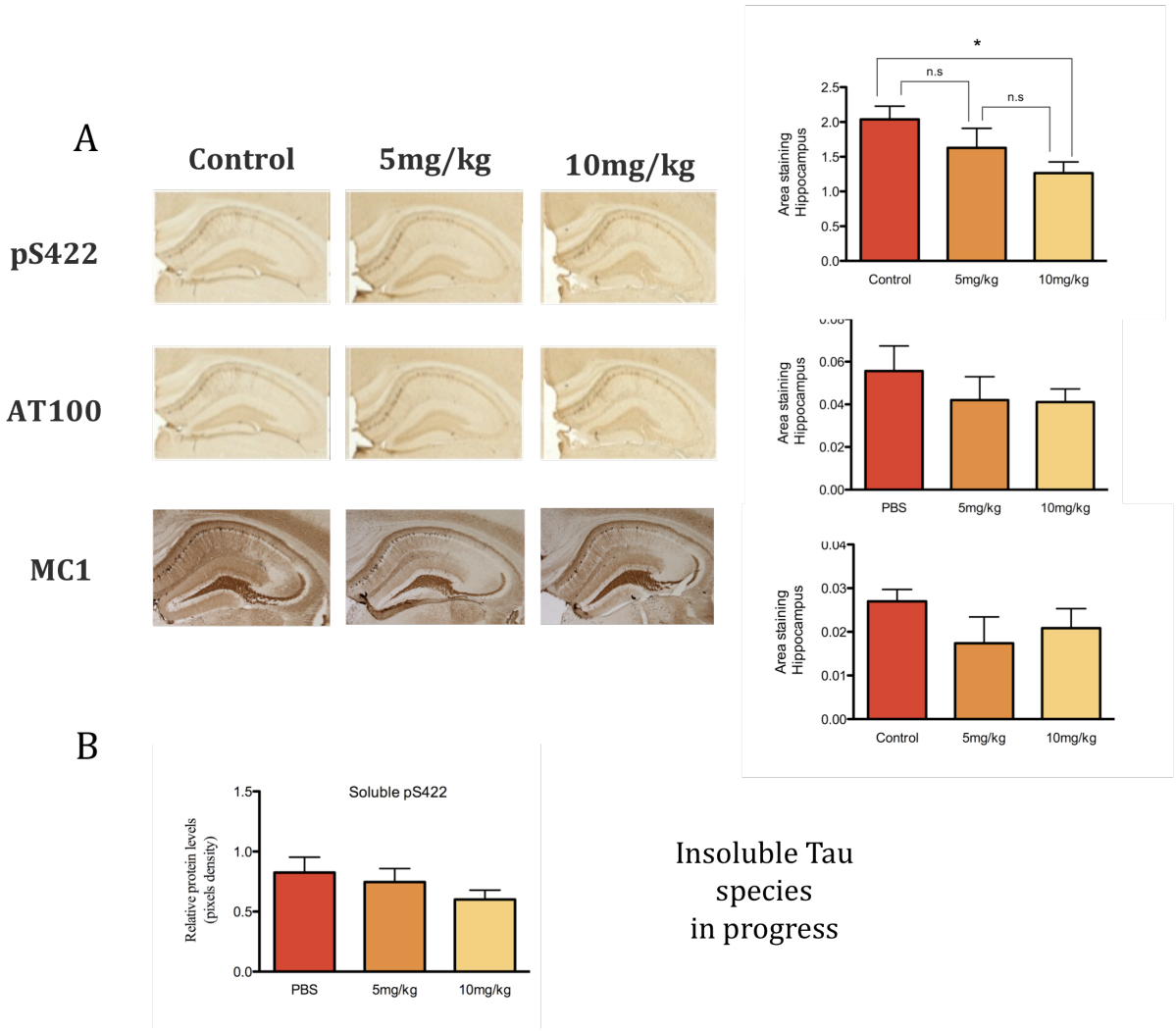


Figure 3. Effects of passive immunotherapy on Tau proteins in THY-Tau22 mice
A. There was no significant difference in the levels of phosphorylated Tau species as revealed by AT100 and MC1 immunoreactivity between injected THY-Tau22 mice and control THY-Tau22 mice. Abnormally phosphorylated Tau species as revealed by pS422 immunoreactivity are decreased in mice injected with 10 mg/kg as compared to THY-Tau22 controls (p=0.0447 using ANOVA). B. Soluble Tau species (pS422-immunoreactive) were decreased by passive tranfert of 10mg/kg of 2H9 antibody (30% reduced compare to control, not significant)

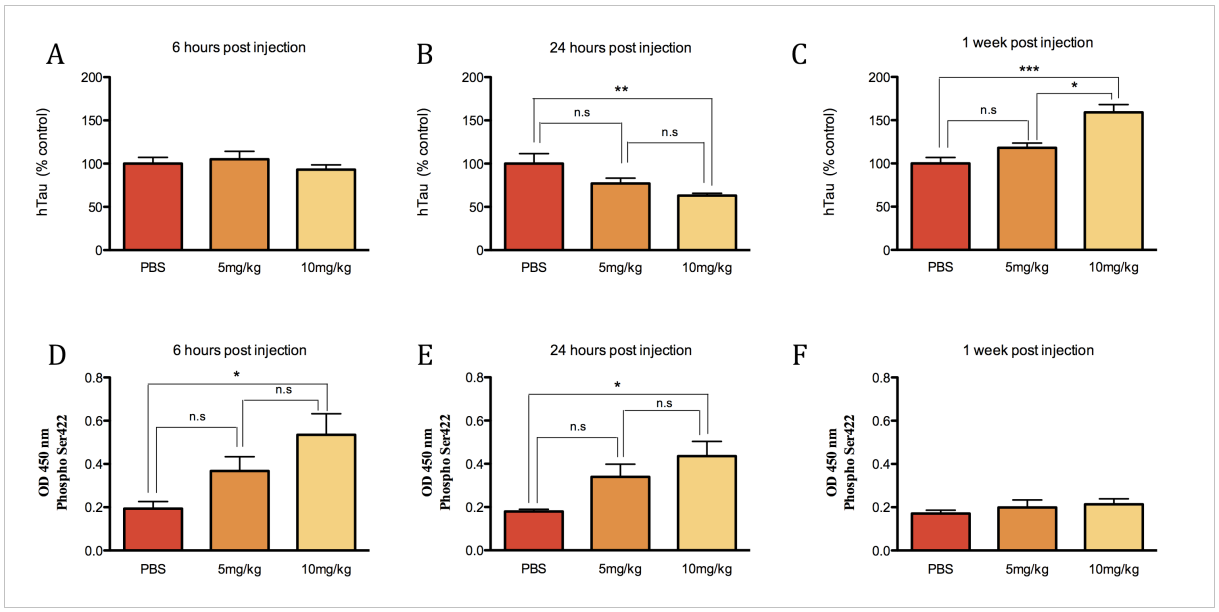


Figure 4. Effects of of a single intraperitoneal injection of 2H9 on Tau protein in plasma
A. After 6 hours, the levels of Tau in plasma was similar between the groups. B. After 24 hours, we observed a significant decrease of Tau in the plasma of THY-Tau22 injected with 10mg/kg compare to control. C. This result is completly reverse after one week as THY-Tau22 injected with 10mg/kg of 2H9 have significantly more plasmatic Tau compare to controls. In the same sample, we measured the level of antibodies raised against pS422 (D-F). Antibodies were totally cleared after one week. The rate of clearance appears faster than endogenous IgG (typical half-life 21-28 days). N= 6 per group per each time.

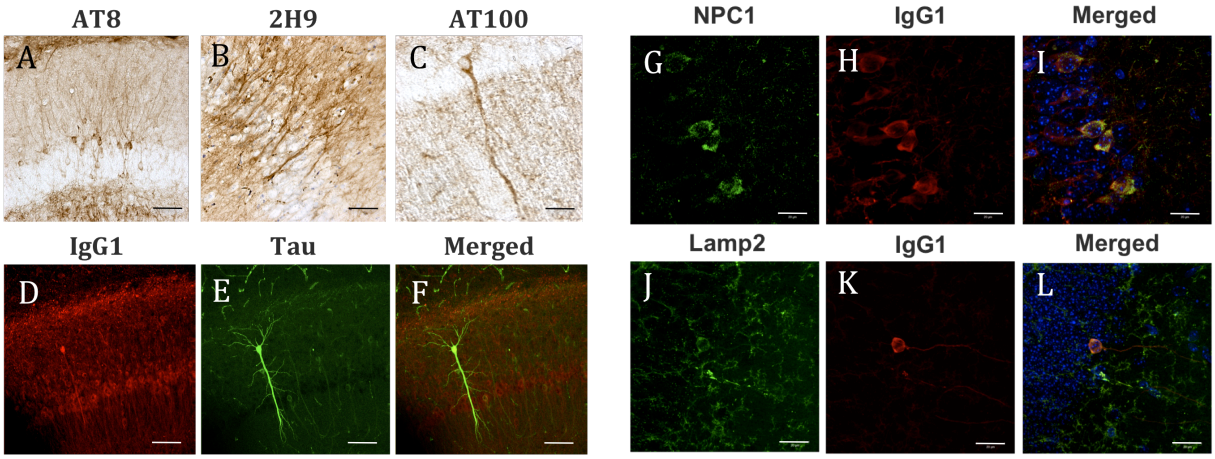


Figure 5. Co-localization of Tau antibody with lysosomal markers in the THY-Tau22 mice brain.

To investigate the localisation of antibody into the brain we injected three different antibodies against hyperphosphorylated Tau (A) and pathological Tau (B-C). D-F. Representative confocal image of a brain section from an THY-Tau22 mouse injected with AT8 and co-labeled with an antibody against Tau. F-H. Confocal image from a THY-Tau22 mouse injected AT8 and co-labeled with an antibody against NPC1. J-L. Confocal image from a THY-Tau22 mouse injected AT8 and co-labeled with an antibody against Lamp2. Scale bar (A, B, D-F) = 30 µM (C, G-L) = 20 µM.

REFERENCES

Asuni et al. Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. Journal of Neuroscience (2007) vol. 27 (34) pp. 9115-29

Augustinack et al. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. Acta neuropathologica (2002) vol. 103 (1) pp. 26-35

Belarbi et al. Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. Neurobiology of Disease (2011) vol. 43 (2) pp. 486-94

Belarbi et al. Early Tau pathology involving the septo-hippocampal pathway in a Tau transgenic model: relevance to Alzheimer's disease. Current Alzheimer research (2009) vol. 6 (2) pp. 152-7

Boimel et al. Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. Experimental Neurology (2010) pp. 1-14

Boutajangout et al. Targeting hyperphosphorylated tau protein with a monoclonal antibody at an advanced stage of tau pathology improves cognition in a mouse model. Alzheimer's & Dementia (2011) vol. 7 (S) pp. S480-S481

Boutajangout et al. Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. Journal of Neurochemistry (2011)

Boutajangout et al. Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model. Journal of Neuroscience (2010) vol. 30 (49) pp. 16559-16566

Bussière et al. Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. Acta neuropathologica (1999) vol. 97 (3) pp. 221-30

Cartier et al. AAV gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase improves Alzheimer's phenotype of tau mouse model. Alzheimer's & Dementia (2011) vol. 7 (S) pp. S651

Chai et al. Passive immunization with anti-tau antibodies in two transgenic models: Reduction of tau pathology and delay of disease progression. Journal of Biological … (2011)

Clavaguera et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. Nature cell biology (2009) vol. 11 (7) pp. 909-13

D'abramo et al. Passive immunization of P301L mice with two different tau monoclonal antibodies. Alzheimer's & Dementia (2011) vol. 7 (S) pp. S481

De Calignon et al. Caspase activation precedes and leads to tangles. Nature (2010) vol. 464 (7292) pp. 1201-4

De Gassart. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. Blood (2003) vol. 102 (13) pp. 4336-4344

DeMattos et al. Peripheral anti-A beta antibody alters SNC and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2001) vol. 98 (15) pp. 8850-5

Deters et al. Divergent phosphorylation pattern of tau in P301L tau transgenic mice. European Journal of Neuroscience (2008) vol. 28 (1) pp. 137-47

Frost et al. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. The Journal of biological chemistry (2009) vol. 284 (19) pp. 12845-52

Guillozet-Bongaarts et al. Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. Acta neuropathologica (2007) vol. 113 (5) pp. 513-20

Haase et al. Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. Journal of Neurochemistry (2004) vol. 88 (6) pp. 1509-20

Jeugd et al. Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. Neurobiology of Learning and Memory (2011) vol. 95 pp. 296-304

Jicha. Is passive immunization for Alzheimer's disease 'alive and well' or 'dead and buried'?. Expert opinion on biological therapy (2009) vol. 9 (4) pp. 481-91

Krishnamurthy et al. Mechanistic studies of antibody clearnace of tau aggregates using an ex vivo brain slice. Alzheimer's and Dementia (2010) vol. 6 (S276) pp. 1-1

Lasagna-Reeves et al. Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. Molecular neurodegeneration (2011) vol. 6 pp. 39

Lee et al. Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: Problems and perspectives. Neuroscience research (2011) pp.

Lemere et al. Amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease transgenic mouse models and wildtype mice. Neurochemical research (2003) vol. 28 (7) pp. 1017-27

Leroy et al. Early axonopathy preceding neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice. The American Journal of Pathology (2007) vol. 171 (3) pp. 976-92

Levites et al. Anti-Abeta42- and anti-Abeta40-specific mAbs attenuate amyloid deposition in an Alzheimer disease mouse model. The Journal of clinical investigation (2006) vol. 116 (1) pp. 193-201

Masliah et al. Passive Immunization Reduces Behavioral and Neuropathological Deficits in an Alpha-Synuclein Transgenic Model of Lewy Body Disease. PloS one (2011)

Masliah et al. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. Neuron (2005) vol. 46 (6) pp. 857-68

Orgogozo et al. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. Neurology (2003) vol. 61 (1) pp. 46-54

Pandey. Hybridoma technology for production of monoclonal antibodies. Hybridoma (2010) vol. 1 (2) pp. 017

Rabchevsky et al. Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. Brain research (1999) vol. 832 (1-2) pp. 84-96

Rosenmann et al. Detection of circulating antibodies against tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. Neuroscience letters (2006) vol. 410 (2) pp. 90-3

Schindowski 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. The American journal of pathology (2006) vol. 169 (2) pp. 599-616

Schraen-Maschke et al. Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases. Biomarkers in medicine (2008) vol. 2 (4) pp. 363-84

Sigurdsson. Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. Journal of Alzheimer's disease : JAD (2008) vol. 15 (2) pp. 157-68

3. CONCLUSIONS

Dans le cadre de cette étude, nous avons évalué les effets du transfert passif répété d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine Tau phosphorylée en Ser422. Cet anticorps nommé 2H9, a été généré en collaboration avec le laboratoire de Philippe Lassalle de l'institut Pasteur de Lille. Des souris THY-Tau22 âgées de 15 semaines ont été injectées, chaque semaine, par voie intrapéritonéale, avec 5mg/kg et 10mg/kg de 2H9 ou une solution saline. Nous montrons que l'injection répété de 2H9 prévient l'apparition de déficits de mémoire spatiale mesurée par les tests du labyrinthe en Y et de la piscine de Morris. Les analyses immunohistochimiques révèlent, au niveau de l'hippocampe, une réduction significative des protéines Tau anormalement phosphorylées en Ser422 et une tendance à la diminution du marquage AT100 et MC1 (réduction de 26 et 23% des souris 10mg/kg par rapport aux souris contrôles, respectivement).

Afin d'étudier les mécanismes sous jacents à l'immunothérapie anti Tau, nous avons injecté des anticorps anti-phosphoTau par stéréotaxie au niveau de l'hippocampe de souris THY-Tau22. Nous montrons, qu'une fois au sein du cerveau, ils sont capables d'entrer dans les neurones contrairement au contrôle isotypique. Plusieurs études récentes d'immunothérapie, suggèrent une implication de la macroautophagie dans la dégradation médiée par les anticorps. Nous montrons que les anticorps internalisés dans les neurones colocalisent avec différents marqueurs de la voie lysosomiale (NPC1, Lamp2) confirmant l'hypothèse d'une dégradation par le lysosome. Cependant, la barrière hémato encéphalique étant très sélective, il est fort probable que les anticorps générés restent en périphérie. Nous montrons, que l'administration périphérique de 250µg d'anticorps 2H9 génère une augmentation significative de la protéine Tau au niveau plasmatique suggérant un mécanisme de siphon périphérique comme dans l'immunothérapie Aβ. L'ensemble des résultats de cette deuxième étude confirme l'hypothèse d'une dégradation périphérique de la protéine Tau.

DISCUSSION

Les maladies neurodégénératives (MND) constituent un groupe de pathologies caractérisées par la mort des neurones dans des régions spécifiques du cerveau. Certaines sont d'origine génétique, d'autres d'origine environnementale, voire les deux. Leurs étiologies et leurs mécanismes physiopathologiques sont très variables, très certainement plurifactoriels et impliquant probablement des facteurs de vulnérabilité individuels. Néanmoins, la plupart de ces affections présentent des caractéristiques communes. La plus notable est le changement de conformation et l'agrégation de protéines constitutives de l'hôte. De récentes études suggèrent que ces agrégats protéiques sont transmissibles d'une cellule à l'autre et probablement responsables de la propagation des lésions au sein du cerveau (pour revues Lee S.J et al., 2011 ; Jucker et Walker, 2011). Cette nouvelle hypothèse confirme l'intérêt de l'immunothérapie dans le traitement des MND (pour revue Brody et Holtzman, 2008) notamment pour les Tauopathies (pour revue Gu et Sigurdsson, 2011).

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont eu pour but d'étudier les effets de l'immunothérapie anti-Tau dans un modèle murin de pathologie Tau de type Alzheimer, la lignée THY-Tau22.

L'objectif de cette approche est de générer des anticorps spécifiques de la protéine Tau pathologique afin de réduire son agrégation et de prévenir les déficits cognitifs associés à la pathologie.

Immunothérapie active

Dans un premier temps, nous avons évalué les effets de l'immunothérapie active dirigée contre la protéine Tau pSer422. Nous montrons que la vaccination contre cet épitope unique génère des anticorps spécifiques de la protéine pathologique. Cette spécificité vis à vis de la phosphorylation pathologique est un critère exclusif. En effet, le groupe de Rosenmann a montré qu'une réponse immunitaire contre la protéine Tau neuronale, non phosphorylée, était délétère (Rosenmann et al., 2006). Cette vaccination effectuée précocement (à l'âge de 15 semaines) prévient les déficits de mémoire spatiale, évalués par le test du labyrinthe en Y (Y-Maze), après 18 semaines de traitement. D'autres tests comportementaux, notamment le test de la piscine de Morris évaluant l'apprentissage et la mémoire spatiale dépendant de la fonction hippocampique (Vorhees et Williams, 2006) ou le test de mémoire contextuelle de peur conditionnée mobilisant le complexe amygdalien et l'hippocampe (Phillips et LeDoux, 1992) auraient été nécessaires pour investiguer plus en détail les capacités mnésiques des

souris. Malheureusement, au moment de l'évaluation comportementale des souris, aucun de ces tests n'étaient disponibles au sein du laboratoire. Toutefois, le test du labyrinthe en Y révèle la capacité de la vaccination à prévenir les déficits de mémoire à court terme chez les souris THY-Tau22. Cette amélioration cognitive est associée à une réduction de la pathologie Tau hippocampique. L'étude par immunohistochimie des coupes d'hippocampe permet d'observer, au niveau de la CA1, une large tendance à la baisse de la surface marquée par deux anticorps pathologiques : AT100 et pSer422 (p=0.0516 pour AT100 et p=0.0842 pour pS422 ; test de Student). Le nombre d'animaux par groupe (n= 6-7) et l'hétérogénéité du modèle peuvent expliquer l'absence de significativité. Néanmoins, notre méthode de quantification est critiquable car la pathologie Tau, même si elle démarre au niveau de la CA1, s'étend rapidement au gyrus denté et à la CA2/CA3. D'autre part, même si la pathologie Tau est essentiellement hippocampique, elle est également très présente au niveau de l'amygdale et de façon beaucoup plus modérée au niveau du tronc cérébral et du cortex. Parmi ces structures, seul l'hippocampe a été analysé, par la suite, grâce au logiciel Mercator (Exploranova) ainsi que le cortex. Cette analyse a confirmé la réduction des protéines Tau pS422 au niveau de l'hippocampe. Aucune différence n'a été observée au niveau du cortex. Les résultats les plus marqués étant visualisés avec un anticorps dirigé contre la pS422, la question de l'encombrement stérique s'est posée. Un traitement au citrate a confirmé qu'une partie de la baisse de marquage pS422 pouvait être attribuée à un encombrement stérique mais une partie seulement. Les effets de la vaccination sont donc très peu marqués au niveau immunohistochimique en comparaison aux différentes études de vaccination Tau déjà publiées (Asuni et al., 2007, Boimel et al., 2010, Boutajangout et al., 2010). Toutefois, si l'analyse semi-quantitative de l'immunohistochimie ne permet d'observer qu'une tendance à la baisse de la pathologie Tau, les analyses biochimiques révèlent une réduction significative des espèces insolubles de Tau.

Aussi, la phosphorylation en sérine 422 a été montré comme potentiellement protectrice vis à vis du clivage en aspartate 421 (D421) et plusieurs études suggèrent que la troncation de Tau favorise son agrégation (pour revues Garcia-Serra et al., 2008 ; Hanger et Wray, 2010). A l'âge de 9 mois, la présence de Tau clivée en D421 est très réduite dans le modèle et ne nous a pas permis de vérifier cette hypothèse. On peut toutefois imaginer que les anticorps dirigés contre la pS422 soient capables de bloquer le site de clivage et d'empêcher la troncation de Tau limitant ainsi son agrégation.

A l'âge de 9-10 mois, les souris THY-Tau22 présentent une altération de la phase de maintien de la LTD au niveau de l'hippocampe sans pertes neuronales ni synaptiques majeures (Jeugd et al., 2011). Bien que les mécanismes à l'origine de ces déficits demeurent inconnus, une altération du trafic intracellulaire peut être mis en cause. De précédents travaux sur le modèle THY-Tau22 ont notamment mis en évidence une perte d'expression de SAP102 et SAP97, protéines nécessaires au transport et à l'ancrage à la membrane des récepteurs glutamatergiques (Manuscrit de thèse Sylvie Burnouf, 2010) L'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau sont connues pour influencer le transport axonal. Aussi, les agrégats de protéines Tau sont susceptibles de séquestrer un certain nombre de protéines nécessaires au bon fonctionnement des neurones et à la plasticité synaptique. Ainsi, on peut imaginer qu'en diminuant les formes agrégées de Tau, on agisse sur la plasticité synaptique qui est particulièrement impliquée dans les processus mnésiques. Il serait intéressant de vérifier la LTD chez les animaux vaccinés ainsi que l'expression des protéines SAP102 et SAP97.

A l'âge de 12 mois, la pathologie Tau présente au niveau de l'axe septohippocampique des souris THY-Tau22 semble également impliquée dans les déficits mnésiques. En effet, on peut observer une perte des neurones cholinergiques du septum médian projetant sur l'hippocampe associée à une altération du transport rétrograde du NGF (Nerve Growth Factor) (Belarbi et al., 2011a; Belarbi et al., 2009). Cette altération de transport du NGF dans le modèle THY-Tau22 renforce l'idée d'une perturbation du transport axonal par la pathologie Tau.

Il aurait été intéressant de prolonger l'immunothérapie jusqu'à l'âge de 12 mois, âge auquel on peut observer l'ensemble de ces déficits (maintien de la LTD, pertes des neurones cholinergiques) probablement impliqués directement ou indirectement dans les déficits mnésiques du modèle.

Enfin, comme un certain nombre de modèles animaux de pathologie Tau (Belluci et al., 2004 ; Sasaki et al., 2008, Zilka et al. 2009), le modèle THY-Tau22 présente une forte inflammation. Or il est maintenant bien connu que l'environnement pro inflammatoire présent dans la plupart des MND (pour revue Amor et al., 2010) peut moduler la plasticité synaptique, la neurogénèse ou encore les déficits de mémoire (pour revue Yirmiya et Goshen, 2011). L'expression du TNF-α, en particulier, est significativement augmentée au niveau central dans notre modèle ainsi que l'expression d'un certain nombre de chemokines telles que CCL3 (Mip-1α), CCL4 (Mip-1β) ou CCL5 (Rantes). De façon intéressante, chez les patients atteints

de la MA, les lymphocytes T surexpriment CXCR2 et Mip-1α qui semblent faciliter leur migration au cerveau (Liu et al., 2010 ; Man et al., 2007). Ces processus semblent dépendants de la sécrétion de TNF-α par la microglie (Liu et al., 2010). La microglie est considérée comme un acteur clé dans la neuroinflammation. Même si son activation est encore un sujet de débat dans la MA (pour revues Wyss-Coray, 2006 ; Schlachetzki et Hüll, 2009), plusieurs travaux soulignent son implication dans la pathologie Tau. L'activation microgliale est corrélée à la pathologie Tau dans plusieurs modèles transgéniques (Belluci et al., 2004 ; Yoshiyama et al., 2007 ; Ikeda et al., 2005, Sasaki et al. 2008 ; Zilka et al., 2009 ; Stozicka et al., 2010 ; Kovak et al ., 2011) et dans certaines Tauopathies comme la PSP ou la DCB (Belluci et al., 2011 ; Sasaki et al. 2008 ; Imamura et al., 2001 ; Ishizawa et Dickson, 2001). L'implication de la microglie dans les processus qui sous-tendent la pathologie Tau est appuyée par plusieurs études qui lui confèrent, en outre, un rôle dans la phosphorylation et l'agrégation de Tau *via* la libération de cytokines pro inflammatoires (Arnaud et al., 2006 ; Lee et al., 2010 ; Gorlovoy et al., 2009 ; Bhaskar et al., 2010). Néanmoins malgré son potentiel neurotoxique, la microglie peut également produire des cytokines bénéfiques telles que l'IL-4, l'IL-10 ou le TGF-β ou encore des facteurs neurotrophiques tels que le NGF, le BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) ou encore NT3 (Neurotrophine 3), pouvant favoriser la survie neuronale. La réponse immunitaire, capable d'orienter l'activation de la microglie et la libération de molécules plus ou moins bénéfiques, est donc une voie de recherche particulièrement importante.

Depuis les complications survenues lors du premier essai vaccinal AN-1792, les approches d'immunothérapies dans les MND s'orientent vers une réponse de type T_H2/T_{reg} favorisant la production d'anticorps et régulant une réponse pro inflammatoire de type T_H1/T_H17 (Wisniewski et Boutajangout, 2010 ; Benner et al., 2004 ; Reynolds et al., 2010). Dans le cadre de la vaccination, nous avons vu que le choix de l'adjuvant était primordial dans l'induction de la réponse. Nous avons pris le parti d'utiliser l'adjuvant de Freund, connu pour induire une forte réponse immunitaire, mais qui se trouve être particulièrement inflammatoire. L'induction d'une réponse immune adaptive de type T_H1 peut exacerber l'inflammation par la sécrétion d'INF-γ, TNF-α ou en activant la microglie (Weiner et Frenkel, 2006), limitant ainsi les effets bénéfiques du vaccin. Au contraire, l'alum, qui a été majoritairement utilisé dans les études de vaccinations Tau, induit une réponse de type T_H2. Ce type de réponse, sécrétrice de cytokines telles que l'IL-10, IL-4 ou l'IL-5, peut exercer une effet bénéfique en régulant la production de cytokines pro inflammatoire tel que le TNF-α ou

de facteurs neurotrophiques tels que le BDNF ou le GNDF (McQuillan et al., 2010 ; Derecki et al., 2010). La voie d'administration ou encore la présence d'épitope de reconnaissance des cellules B ou T sur le peptide immunogène sont d'autres facteurs capables de moduler la réponse immunitaire. Il est important de noter que le fond génétique peut également moduler les effets d'un vaccin (Stozicka et al., 2010 ; Richter et al., 2011).

L'immunothérapie Tau doit non seulement permettre d'éliminer les agrégats de protéines Tau mal conformées, mais également d'atténuer l'inflammation délétère pour le SNC. Dans le cadre de notre étude, il aurait été particulièrement intéressant de vérifier un certain nombre de paramètres inflammatoires notamment la production de cytokines et chemokines pro inflammatoires qui semblent jouer un rôle dans la pathologie Tau mais également de facteurs trophiques tels que le BDNF ou le NGF.

La vaccination contre la protéine Tau pSer422 a permis d'améliorer les déficits de mémoire spatiale observés chez les souris THY-Tau22 et de réduire les espèces insolubles de Tau. L'inflammation joue certainement un rôle majeur dans les mécanismes sous-jacents à la vaccination, toute la difficulté consiste à la moduler de façon bénéfique. Afin de réduire le risque d'une réponse inflammatoire délétère, l'une des solutions consiste à injecter directement les anticorps. Suite aux résultats de la vaccination contre la pS422 nous avons décidé d'étudier les effets de l'immunothérapie passive. Pour cela, nous avons généré, en collaboration avec l'équipe de Philippe Lassalle de l'institut Pasteur de Lille, un anticorps monoclonal (2H9) dirigé contre la pS422 de la protéine Tau.

Immunothérapie passive

L'anticorps a été injecté, par voie intrapéritonéale, chaque semaine, dès l'âge de 15 semaines, à une dose de 5mg/kg ou 10mg/kg. Nous montrons que l'injection de 2H9 à une dose de 10mg/kg, pendant 6 mois, prévient les déficits de mémoire spatiale, observés par le test du labyrinthe en Y et le test de la piscine de Morris. Les effets de l'injection à 5mg/kg sont plus modérés, nous n'observons qu'une amélioration cognitive par le test du labyrinthe en Y. L'amélioration cognitive est associée à une réduction du marquage pS422 dans l'hippocampe pour les souris traitées avec 10mg/kg de 2H9 et une tendance à la réduction du marquage AT100 et MC1. D'un point de vue biochimique, contrairement à la vaccination, nous observons une tendance à la réduction des formes solubles de Tau. Ce résultat peut s'expliquer par les modifications apportées au protocole de fractionnement. La centrifugation de 12000g est remplacée par une brève centrifugation de paillasse ce qui permet de perdre

moins de matériel dans le culot de débris. L'ajout de NaCl avant cette centrifugation peut également permettre de solubiliser davantage de protéines avant l'ultracentrifugation. Cette réduction peut également être due à l'unique action de notre anticorps 2H9 et les effets sont donc difficilement comparables à la vaccination. En effet, outre le fait que la vaccination génère une réponse polyclonale, l'aspect inflammatoire est également plus important. Dans le cadre de l'immunothérapie passive, on se prive d'une composante majeure de la réponse immunitaire à savoir la réponse cellulaire et les effets sont presque exclusivement dus à l'anticorps. La spécificité et l'affinité d'un anticorps unique ne sont pas comparables à une réponse polyclonale même mono spécifique. La question qui se pose ensuite est : comment un anticorps injecté en périphérie peut agir sur une protéine du SNC et qui plus est, intraneuronale ?

Le cerveau est un site privilégié, protégé par la présence de la barrière hémato-encéphalique : une structure composée de cellules endothéliales, d'astrocytes, de neurones périvasculaires, et de péricytes (Abbott et al., 2010). Outre la BHE, il existe une deuxième barrière entre la circulation sanguine et le système nerveux central : la barrière sang-LCR. Cette barrière est formée par les cellules épithéliales et les jonctions serrées des plexus choroïdes (figure 22). Les cellules endothéliales sont reliées par des jonctions serrées qui forment une barrière impénétrable sauf à des composés hautement lipidiques ou à de petites molécules de moins de 500 Da. Ainsi, l'accès à des molécules thérapeutiques de grosse taille telles que les anticorps (150kD) est un vrai problème.

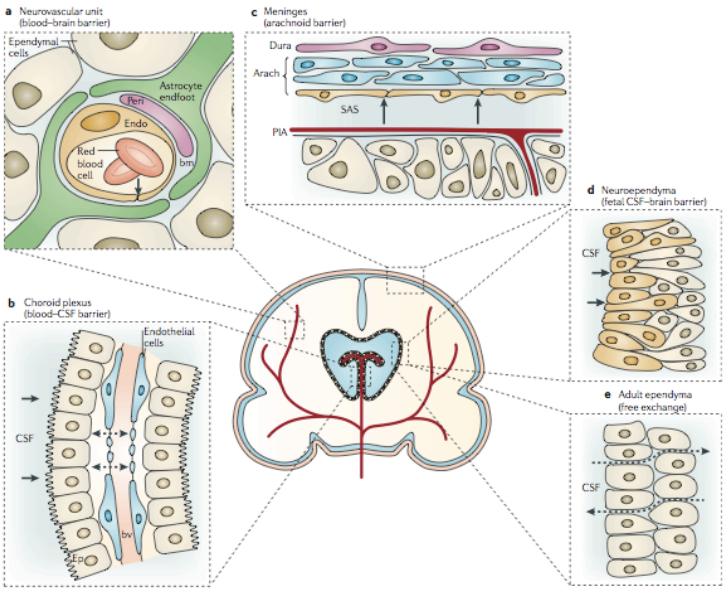


Figure 22. Les barrières du cerveau

La barrière hémato-encéphalique est formée par les cellules endothéliales des capillaires sanguins et est caractérisée par l'existence de jonction serrées. b. Outre la BHE, il existe une deuxième barrière entre la circulation sanguine et le système nerveux central : la barrière sang-LCR. Cette barrière est formée par les cellules épithéliales et les jonctions serrées des plexus choroïde. Tirée de (Neuwelt et al., 2011)

Néanmoins, dans notre étude, plusieurs mécanismes pourraient permettre aux anticorps d'atteindre les neurones. En effet, la perméabilité de la BHE peut être modulée par différents facteurs. Elle est notamment très sensible à la présence de cytokines (Banks et al., 2009a). L'inflammation importante du modèle THY-Tau22 peut conduire à une augmentation de la perméabilité (Wright et Merchant, 1994 ; Kovak et al., 2009 ; Nishioku et al., 2010) particulièrement à des sites dépourvus de BHE tels que les plexus choroïdes et les leptoméninges. La sécrétion de cytokines inflammatoires induit également l'augmentation de l'expression par les cellules endothéliales des molécules d'adhérence (notamment ICAM-1 et VCAM-1) qui favorisent la migration transendothéliale des leucocytes en activant diverses cascades de signalisation dans les cellules endothéliales cérébrales (Etienne-Manneville et al. 2000; Greenwood et al. 2003). Ainsi, il est tout à fait possible que les lymphocytes B pénètrent également la BHE et secrètent directement les anticorps au sein du cerveau (Banks et al., 2009 ; Engelhardt et al., 2008). Dans le cas de la vaccination, une inflammation périphérique, induite par l'adjuvant de Freund, peut également augmenter la perméabilité de la BHE (Rabchevsky et al., 1999). Ainsi, il est très probable que les anticorps accèdent au cerveau du fait d'une barrière moins perméable. La transcytose qui permet à des molécules telles que l'insuline ou la transferrine d'être acheminé au cerveau, peut également jouer un rôle dans le passage des anticorps à travers la BHE (Zlokovic et al., 1990). Il est tout de même important de noter que de manière générale les taux d'anticorps retrouvés au cerveau restent faibles pour avoir un effet thérapeutique (Banks et al., 2002 ; Bard et al., 2000 ; DeMattos et al., 2001 ; Levites et al., 2006a). Il est donc nécessaire d'améliorer l'accès des anticorps au cerveau (pour revues Gabathuler, 2009 ; Frank et al., 2011). A ce jour, des stratégies reposant sur la transcytose médiée par les récepteurs ou « Trojan horse », sont déjà explorées dans la maladie d'Alzheimer pour réduire les dépôts amyloïdes (Zhou QH. et al., 2010 ; Boado et al., 2010) ou dans la maladie de Parkinson pour délivrer du GDNF (Fu et al., 2010). Il est tout à fait envisageable d'utiliser ce type d'approche pour les Tauopathies.

Même si nous n'avons pu vérifier la présence d'anticorps dans le cerveau des souris traitées faute de méthode assez sensible. On peut imaginer qu'une fois au sein du cerveau, les anticorps agissent soit à l'intérieur des neurones ou dans le milieu extracellulaire. Tout comme l'α-synucléine, la protéine Tau peut être associée à la membrane et ainsi être plus facilement reconnue par les anticorps. Après injection stéréotaxique dans l'hippocampe de souris THY-Tau22 âgées de 6 mois, nous observons que les anticorps AT8 (hyperphosphorylation pSer202/205), AT100 (pathologique pThr212/Ser214) et 2H9

(pathologique pSer422), dirigés contre la protéine Tau, sont internalisés contrairement au contrôle isotypique. Des résultats similaires ont été observés dans les travaux d'immunothérapie contre l'α-synucléine (Masliah et al., 2005b, 2011) ainsi que contre la protéine Tau pSer396/404 (Asuni et al., 2007) et plus récemment, la protéine Tau pSer422 (Bohrmann et al., 2011). Plusieurs récepteurs présents à la membrane neuronale peuvent potentiellement internaliser les anticorps : Thy1.1 (Fabian, 1990), les récepteurs Fcγ (Mohamed et al., 2002) ou encore LRP (Kounnas et al., 1995) mais il a été également suggéré que les anticorps entrent par pynocytose (Sigurdsson et al., 2008). La dégradation des protéines Tau peut être prise en charge par la voie lysosomiale (Hamano et al., 2008 ; Wang et al., 2009 ; Kim et al., 2011). Il est possible qu'une fois les anticorps internalisés, le complexe anticorps-Tau soit dégradé par le lysosome (Asuni et al., 2007 ; Krishnamurthy et al., 2010, Masliah et al., 2005b, 2011). Nous observons une colocalisation des anticorps anti-Tau avec Lamp2, une protéine de la membrane lysosomiale mais également avec NPC1, fortement impliqué dans les phénomènes de dégradation médiés par le lysosome (Goldman and Krise, 2010). Des mutations sur les gènes NPC1 et NPC2 peuvent conduire à une pathologie Tau, telle qu'observée dans le cas dans la maladie de Niemann-Pick de type C (Ohm et al., 2003; Yu et al., 2005). Or, de manière intéressante, une précédente étude concernant l'effet de l'exercice volontaire sur la pathologie Tau menée chez les THY-Tau22 a montré une augmentation de l'expression des transcrits de NPC1 et NPC2 dans l'hippocampe des souris THY-Tau22 ayant pratiqué une activité physique (Belarbi et al., 2011b). Cette augmentation des transcripts associées à la réduction des protéines Tau anormalement phosphorylées suggère une dégradation de Tau par le lysosome. Cette hypothèse est renforcée par une étude montrant que NPC1 protège de la pathologie Tau dans une modèle transgénique P301L (Zonnur et al., 2010). Autre fait intéressant, NPC1 est particulièrement impliqué dans la dégradation du cholestérol par le lysosome. Plusieurs évidences suggèrent un lien entre Tau et lipides. Tau interagît avec la membrane plasmique, composée de lipides et de cholestérol, par l'intermédiaire de son domaine amino-terminal (Brandt et al., 1995 ; Pooler et Hanger, 2011).

Or, une récente étude a montré que la surexpression de CYP46A1, enzyme clé dans la régulation du métabolisme intracérébral du cholestérol, réduit la phosphorylation anormale de Tau chez la souris THY-Tau22 et corrige les déficits cognitifs observés par le test de la piscine de Morris (Cartier et al., 2011). Les radeaux lipidiques semblent particulièrement impliqués dans les phénomènes de communication intercellulaire notamment dans la formation des exosomes (Gassart et al., 2003). Ainsi on peut imaginer que les anticorps

favorisent la dégradation par le lysosome des radeaux lipidiques contenant cholestérol et protéines Tau et empêchent de cette manière la propagation de la protéine Tau. Sur le même principe, les anticorps peuvent également agir à l'extérieur du neurone en empêchant sa sécrétion, en bloquant la transmission synaptique ou en favorisant sa dégradation/clairance (figure 23).

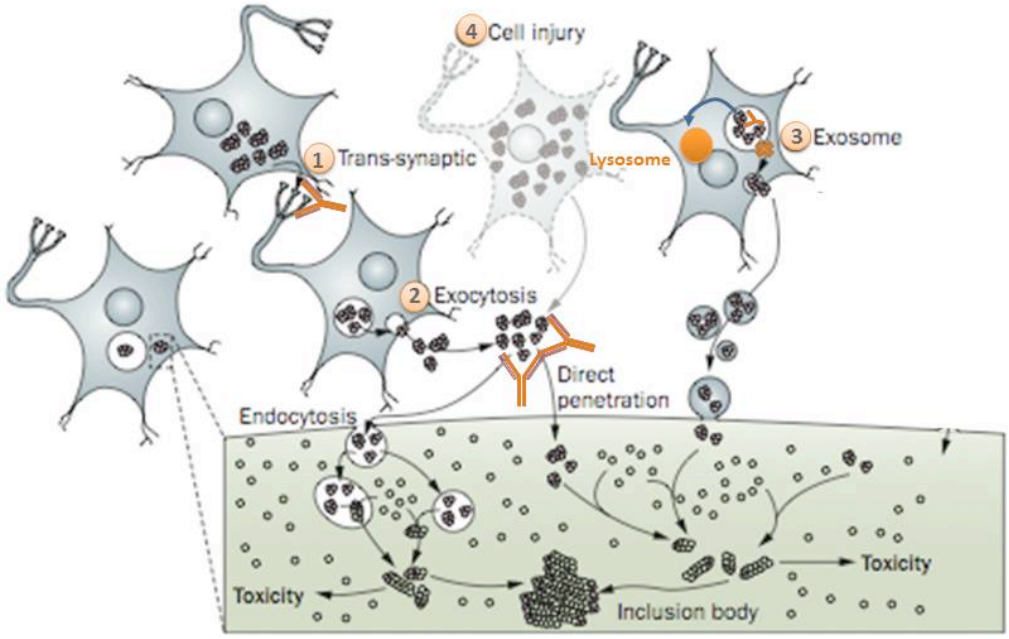


Figure 23. Action des anticorps sur les mécanismes de propagation de la protéine Tau

Les anticorps peuvent réduire l'agrégation de la protéine Tau en empêchant la transmission synaptique (1), ou en bloquant la propagation par le milieu extracellulaire (2 et 4). Enfin, les anticorps peuvent agir en promouvant la dégradation de tau par le lysosome (3). Adaptée de (Lee S.J et al., 2011)

Les anticorps peuvent activer la microglie notamment *via* le récepteur Fc et induire la sécrétion de cytokines favorisant la dégradation de Tau (Minami et al., 2010). Il se peut également que le complexe Ac-Tau soit transféré vers le système périphérique par le récepteur néonatal Fc (FcRn) situé au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Deane et al., 2005; Zhang and Pardridge, 2001). Cette hypothèse pourrait expliquer l'augmentation de la protéine Tau au niveau plasmatique observée suite à la vaccination et à l'injection périphérique de l'anticorps 2H9. Il se peut également que les anticorps restent en périphérie et favorisent l'efflux des protéines Tau. Cependant, cette augmentation de la protéine Tau dans le plasma peut être également être expliquée par l'effet stabilisateur des anticorps sur la protéine Tau, augmentant ainsi sa demi vie (Seubert et al., 2008 ; Levites et al., 2006a). L'ensemble des hypothèses quant à la dégradation de la protéine Tau par les anticorps n'est que pure spéculation. Dans le cadre de notre étude, il serait intéressant de tester la capacité de notre

anticorps 2H9 à traverser la BHE en utilisant un modèle de BHE *in vitro*. Ce type d'étude, déjà mis en place pour le peptide Aβ (Bachmeier et al., 2011 ; Rutgers et al., 2011), offre de réelles possibilités quand à l'étude des mécanismes de clairance de la protéine Tau. Afin de disséquer les mécanismes potentiels de dégradation de la protéine Tau par les anticorps, il est nécessaire de passer par des modèles plus simples comme des modèles de BHE ou des modèles cellulaires.

En conclusion, ces travaux de thèse ne sont pas novateurs dans le sens où plusieurs groupes ont déjà publié des travaux similaires avec des résultats plus ou moins marqués. Néanmoins, peu d'entre eux mettent en évidence les effets de l'immunothérapie Tau à améliorer les capacités cognitives dans un modèle de pathologie Tau adapté. En effet, le modèle THY-Tau22 possède les caractéristiques d'un stade précoce de dégénérescence neurofibrillaire dans la MA et, par conséquent, est un modèle tout à fait pertinent pour évaluer le potentiel de l'immunothérapie. Cependant, il reste un modèle surexprimant une isoforme de Tau mutée. Or, aucune mutation n'a été retrouvée dans la MA ni dans d'autres Tauopathies à l'exception des FTDP-17. Aussi, un modèle, tel le modèle de rat développé au laboratoire, mimant le caractère propagateur de la protéine Tau, en exprimant une isoforme de Tau non mutée serait un véritable atout pour étudier les effets de l'immunothérapie sur ce phénomène.

De manière générale, nos travaux montrent que l'immunothérapie dirigée contre un épitope pathologique de la protéine Tau est capable de réduire la pathologie Tau hippocampique et de prévenir les altérations mnésiques des souris THY-Tau22. Il semblerait toutefois que l'immunothérapie passive soit moins efficace que la vaccination. Ce constat, met en avant le rôle probablement majeur de l'inflammation et de l'immunité cellulaire dans l'efficacité d'une approche immunothérapeutique. Il semblerait également qu'une approche de transfert passif nécessite un anticorps avec une grande affinité, caractéristique qui semble faire défaut à notre anticorps monoclonal 2H9 et pourrait expliquer la faible efficacité de notre approche. Enfin, l'ensemble de ces travaux confirme l'hypothèse d'une dégradation par la voie lysosomiale dans le cas où les anticorps pénètrent le SNC et propose une nouvelle hypothèse quant à la dégradation de la protéine Tau médiée par les anticorps: l'effet siphon périphérique.

Dans l'ensemble, les résultats précliniques sur l'immunothérapie Tau sont encourageants mais restent préliminaires. De nouveaux travaux consistant à étudier notamment les facteurs génétiques individuels impliqués dans la réponse immunitaire (comme

les haplotypes HLA) ou encore la part de l'immunité cellulaire sont nécessaires avant d'envisager des essais cliniques. L'immunothérapie Tau et plus généralement l'immunothérapie dans les MND n'en est qu'à ses débuts et le système immunitaire offre de nombreuses possibilités.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

Abbott, N. J., A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley (2010) "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiology of Disease **Volume**, 13-25 DOI:

Abraha, A., N. Ghoshal, T. C. Gamblin, V. Cryns, R. W. Berry, J. Kuret and L. I. Binder (2000). C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. J Cell Sci. **113 Pt 21:** 3737-45.

Acker, C. and P. Davies (2011). Active and passive immunotherapy in Htau mice. Alzheimer's & Dementia. **7**.

Agadjanyan, M. G., A. Ghochikyan, I. Petrushina, V. Vasilevko, N. Movsesyan, M. Mkrtichyan, T. Saing and D. H. Cribbs (2005). Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from beta-amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. J Immunol. **174:** 1580-6.

Agbo, D. B., F. Neff, F. Seitz, C. Binder, W. H. Oertel, M. Bacher and R. Dodel (2009). Immunization as treatment for Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl**:** 311-5.

Aguzzi, A. and L. Rajendran (2009). The Transcellular Spread of Cytosolic Amyloids, Prions, and Prionoids. Neuron. **64**.

Alonso, A. C., T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (1994). Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA. **91:** 5562-6.

Alonso, A. D., J. Di Clerico, B. Li, C. P. Corbo, M. E. Alaniz, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2010). Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. J Biol Chem. **285:** 30851-60.

Amor, S., F. Puentes, D. Baker and P. van der Valk (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. Immunology. **129:** 154-69.

Andorfer, C., Y. Kress, M. Espinoza, R. de Silva, K. L. Tucker, Y.-A. Barde, K. Duff and P. Davies (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. J Neurochem. **86:** 582-90.

Andorfer, C., C. M. Acker, Y. Kress, P. R. Hof, K. Duff and P. Davies (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. J Neurosci. **25:** 5446-54.

Andreadis, A., W. M. Brown and K. S. Kosik (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. Biochemistry. **31:** 10626-33.

Angot, E., J. A. Steiner, C. Hansen, J.-Y. Li and P. Brundin (2010). Are synucleinopathies prion-like disorders? Lancet Neurol. **9:** 1128-38.

Arbel, M., V. Lavie and B. Solomon (2003). Generation of antibodies against prion protein in wild-type mice via helix 1 peptide immunization. Journal of Neuroimmunology. **144:** 38-45.

Arnaud, L., N. K. Robakis and M. E. Figueiredo-Pereira (2006). It may take inflammation, phosphorylation and ubiquitination to 'tangle' in Alzheimer's disease. Neurodegener Dis. **3:** 313-9.

Arrasate, M., M. Pérez, R. Armas-Portela and J. Avila (1999). Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations. FEBS Lett. **446:** 199-202.

Arrasate, M., M. Pérez and J. Avila (2000). Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. Neurochem Res. **25:** 43-50.
Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte and B. T. Hyman (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. Neurology. **42:** 631-9.
Asuni, A. A., A. Boutajangout, D. Quartermain and E. M. Sigurdsson (2007). Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. Journal of Neuroscience. **27:** 9115-29.
Augustinack, J. C., A. Schneider, E.-M. Mandelkow and B. T. Hyman (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. **103:** 26-35.

B

Bachmeier, C. J., D. Beaulieu-Abdelahad, M. J. Mullan and D. Paris (2011). Epitope-dependent effects of Beta-amyloid antibodies on Beta-amyloid clearance in an in vitro model of the blood-brain barrier. Microcirculation. **18:** 373-9.
Bachy, V., C. Ballerini, P. Gourdain, A. Prignon, S. Iken, N. Antoine, M. Rosset and C. Carnaud (2010). Mouse vaccination with dendritic cells loaded with prion protein peptides overcomes tolerance and delays scrapie. J Gen Virol. **91:** 809-20.
Bacskai, B. J., S. T. Kajdasz, M. E. McLellan, D. Games, P. Seubert, D. Schenk and B. T. Hyman (2002). Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy. J Neurosci. **22:** 7873-8.
Bade, S., M. Baier, T. Boetel and A. Frey (2006). Intranasal immunization of Balb/c mice against prion protein attenuates orally acquired transmissible spongiform encephalopathy. Vaccine. **24:** 1242-53.
Bade, S. and A. Frey (2007). Potential of active and passive immunizations for the prevention and therapy of transmissible spongiform encephalopathies. Expert Rev Vaccines. **6:** 153-68.
Badiola, N., M. Suárez-Calvet and A. Lleó (2010). Tau Phosphorylation and Aggregation as a Therapeutic Target in Tauopathies. CNS Neurol Disord Drug Targets. **9:** 727-740.
Banks, W. A., B. Terrell, S. A. Farr, S. M. Robinson, N. Nonaka and J. E. Morley (2002). Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. Peptides. **23:** 2223-6.
Banks, W. A. and M. A. Erickson (2009). The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. Neurobiology of Disease. **37:** 26-32.
Bard, F., C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, I. Lieberburg, R. Motter, M. Nguyen, F. Soriano, N. Vasquez, K. Weiss, B. Welch, P. Seubert, D. Schenk and T. Yednock (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. Nat Med. **6:** 916-9.
Basurto-Islas, G., J. Luna-Muñoz, A. L. Guillozet-Bongaarts, L. I. Binder, R. Mena and F. García-Sierra (2008). Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. J Neuropathol Exp Neurol. **67:** 470-83.
Bayer, A. J., R. Bullock, R. W. Jones, D. Wilkinson, K. R. Paterson, L. Jenkins, S. B. Millais and S. Donoghue (2005). Evaluation of the safety and immunogenicity of synthetic Abeta42 (AN1792) in patients with AD. Neurology. **64:** 94-101.

Beekes, M. and P. A. McBride (2007). The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. FEBS J. **274:** 588-605.

Belarbi, K., S. Burnouf, F.-J. Fernandez-Gomez, J. Desmercières, L. Troquier, J. Brouillette, L. Tsambou, M.-E. Grosjean, R. Caillierez, D. Demeyer, M. Hamdane, K. Schindowski, D. Blum and L. Buée (2011a). Loss of Medial Septum Cholinergic Neurons in THY-Tau22 Mouse Model: What Links with Tau Pathology? Current Alzheimer research.

Belarbi, K., S. Burnouf, F.-J. Fernandez-Gomez, C. Laurent, S. Lestavel, M. Figeac, A. Sultan, L. Troquier, A. Leboucher, R. Caillierez, M.-E. Grosjean, D. Demeyer, H. Obriot, I. Brion, B. Barbot, M.-C. Galas, B. Staels, S. Humez, N. Sergeant, S. Schraen-Maschke, A. Muhr-Tailleux, M. Hamdane, L. Buée and D. Blum (2011b). Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. Neurobiology of Disease. **43:** 486-94.

Belarbi, K., K. Schindowski, S. Burnouf, R. Caillierez, M.-E. Grosjean, D. Demeyer, M. Hamdane, N. Sergeant, D. Blum and L. Buée (2009). Early Tau pathology involving the septo-hippocampal pathway in a Tau transgenic model: relevance to Alzheimer's disease. Current Alzheimer research. **6:** 152-7.

Bellucci, A., A. J. Westwood, E. Ingram, F. Casamenti, M. Goedert and M. G. Spillantini (2004). Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. The American Journal of Pathology. **165:** 1643-52.

Benner, E. J., R. L. Mosley, C. J. Destache, T. B. Lewis, V. Jackson-Lewis, S. Gorantla, C. Nemachek, S. R. Green, S. Przedborski and H. E. Gendelman (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci USA. **101:** 9435-40.

Benner, E. J., R. Banerjee, A. D. Reynolds, S. Sherman, V. M. Pisarev, V. Tsiperson, C. Nemachek, P. Ciborowski, S. Przedborski, R. L. Mosley and H. E. Gendelman (2008). Nitrated alpha-synuclein immunity accelerates degeneration of nigral dopaminergic neurons. PLoS ONE. **3:** e1376.

Beringue, V., D. Vilette, G. Mallinson, F. Archer, M. Kaisar, M. Tayebi, G. S. Jackson, A. R. Clarke, H. Laude, J. Collinge and S. Hawke (2004). PrPSc binding antibodies are potent inhibitors of prion replication in cell lines. J Biol Chem. **279:** 39671-6.

Bhaskar, K., M. Konerth, O. N. Kokiko-Cochran, A. Cardona, R. M. Ransohoff and B. T. Lamb (2010). Regulation of Tau pathology by the Microglial Fractalkine Receptor. Neuron. **68:** 19-31.

Biernat, J., E. M. Mandelkow, C. Schröter, B. Lichtenberg-Kraag, B. Steiner, B. Berling, H. Meyer, M. Mercken, A. Vandermeeren and M. Goedert (1992). The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. EMBO J. **11:** 1593-7.

Boado, R. J., J. Z. Lu, E. K.-W. Hui and W. M. Pardridge (2010). IgG-single chain Fv fusion protein therapeutic for Alzheimer's disease: Expression in CHO cells and pharmacokinetics and brain delivery in the rhesus monkey. Biotechnol Bioeng. **105:** 627-35.

Bohrmann, B., U. Goepfert and F. Grueninger (2011). Use of an anti-Tau pS422 antibody for the treatment of brain diseases. US Patent App. 12/792,810.

Boimel, M., N. Grigoriadis, A. Lourbopoulos, E. Haber, O. Abramsky and H. Rosenmann (2010). Efficacy and safety of immunization with phosphorylated tau against neurofibrillary tangles in mice. Experimental Neurology**:** 1-14.

Boutajangout, A., D. Quartermain and E. M. Sigurdsson (2010). Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model. Journal of Neuroscience. **30:**

Boutajangout, A., J. Ingadottir, P. Davies and E. M. Sigurdsson (2011a). Passive immunization targetng pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. J Neurochem. **118(4):** 659-67.

Boutajangout, A., H. B. R. Sait, V. Gonzalez and E. Sigurdsson (2011b). Targeting hyperphosphorylated tau protein with a monoclonal antibody at an advanced stage of tau pathology improves cognition in a mouse model. Alzheimer's & Dementia. **7:** S480-S481.

Braak, H. and E. Braak (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. **82:** 239-59.

Braak, H. and K. Del Tredici (2011a). Alzheimer's pathogenesis:is there neuron-to-neuon propagation? Acta Neuropathol**:** 1-7.

Braak, H. and K. Del Tredici (2011b). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. Acta Neuropathol**:** 1-11.

Brady, R. M., R. P. Zinkowski and L. I. Binder (1995). Presence of tau in isolated nuclei from human brain. Neurobiol Aging. **16:** 479-86.

Bramblett, G. T., M. Goedert, R. Jakes, S. E. Merrick, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1993). Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. Neuron. **10:** 1089-99.

Brandt, R., G. Lee, D. B. Teplow, D. Shalloway and M. Abdel-Ghany (1994). Differential effect of phosphorylation and substrate modulation on tau's ability to promote microtubule growth and nucleation. J Biol Chem. **269:** 11776-82.

Brandt, R., J. Léger and G. Lee (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. J Cell Biol. **131:** 1327-40.

Brion, J. P., A. M. Couck, E. Passareiro and J. Flament-Durand (1985). Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. J Submicrosc Cytol. **17:** 89-96.

Brody, D. L. and D. M. Holtzman (2008). Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. Annu Rev Neurosci. **31:** 175-193.

Brunden, K. R., B. Zhang, J. Carroll, Y. Yao, J. S. Potuzak, A.-M. L. Hogan, M. Iba, M. J. James, S. X. Xie, C. Ballatore, A. B. Smith, V. M.-Y. Lee and J. Q. Trojanowski (2010). Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. J Neurosci. **30:** 13861-6.

Brunden, K. R., Y. Yao, J. S. Potuzak, N. I. Ferrer, C. Ballatore, M. J. James, A.-M. L. Hogan, J. Q. Trojanowski, A. B. Smith and V. M.-Y. Lee (2011). The characterization of microtubule-stabilizing drugs as possible therapeutic agents for Alzheimer's disease and related tauopathies. Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society. **63:** 341-51.

Buée, L., T. Bussière, V. Buée-Scherrer, A. Delacourte and P. R. Hof (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. Brain Res Brain Res Rev. **33:** 95-130.

Buée, L., L. Troquier, S. Burnouf, K. Belarbi, A. Van der Jeugd, T. Ahmed, F. Fernandez-Gomez, R. Caillierez, M.-E. Grosjean, S. Begard, B. Barbot, D. Demeyer, H. Obriot, I. Brion, V. Buée-Scherrer, C.-A. Maurage, D. Balschun, R. D'hooge, M. Hamdane, D. Blum and N. Sergeant (2010). From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death? Biochem Soc Trans. **38:** 967-72.

Buée-Scherrer, V., O. Condamines, C. Mourton-Gilles, R. Jakes, M. Goedert, B. Pau and A. Delacourte (1996). AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res. **39:** 79-88.

Bulic, B., M. Pickhardt, I. Khlistunova, J. Biernat, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow and H. Waldmann (2007). Rhodanine-Based Tau Aggregation Inhibitors in Cell Models of Tauopathy. Angewandte Chemie. **119:** 9375-9379.

Bulic, B., M. Pickhardt, E.-M. Mandelkow and E. Mandelkow (2010). Tau protein and tau aggregation inhibitors. Neuropharmacology. **59:** 276-89.

Burdick, D., J. Kosmoski, M. F. Knauer and C. G. Glabe (1997). Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta 1-42, in differentiated PC12 cells. Brain Res. **746:** 275-84.

Bussière, T., P. R. Hof, C. Mailliot, C. D. Brown, M. L. Caillet-Boudin, D. P. Perl, L. Buée and A. Delacourte (1999). Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. Acta Neuropathol. **97:** 221-30.

Butner, K. A. and M. W. Kirschner (1991). Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. J Cell Biol. **115:** 717-30.

C

Caceres, A. and K. S. Kosik (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. Nature. **343:** 461-3.

Campion, D., C. Dumanchin, D. Hannequin, B. Dubois, S. Belliard, M. Puel, C. Thomas-Anterion, A. Michon, C. Martin, F. Charbonnier, G. Raux, A. Camuzat, C. Penet, V. Mesnage, M. Martinez, F. Clerget-Darpoux, A. Brice and T. Frebourg (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. Am J Hum Genet. **65:** 664-70.

Carmel, G., E. M. Mager, L. I. Binder and J. Kuret (1996). The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. J Biol Chem. **271:** 32789-95.

Carnaud, C. and V. Bachy (2010). Cell-based immunotherapy of prion diseases by adoptive transfer of antigen-loaded dendritic cells or antigen-primed CD(4+) T lymphocytes. Prion. **4:** 66-71.

Cartier, N., B. Gautier, M.-A. Burlot, L. Troquier, L. Pradier, P. Aubourg, D. Blum and L. Buee (2011). AAV gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase improves Alzheimer's phenotype of tau mouse model. Alzheimer's & Dementia. **7:** 651.

Casarejos, M., R. Solano and A. Gómez… (2011). The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. Neurochemistry International. **58:** 512-520.

Caviness, J. N., L. Lue, C. H. Adler and D. G. Walker (2010). Parkinson's Disease Dementia and Potential Therapeutic Strategies. CNS Neuroscience & Therapeutics. **17:** 32-44.

Chai, X., S. Wu, T. Murray, R. Kinley, C. Cella, H. Sims, N. Buckner, J. Hammer, P. Davies, M. J. O'neill, M. L. Hutton and M. Citron (2011). Passive immunization with anti-tau antibodies in two transgenic models: Reduction of tau pathology and delay of disease progression. Journal of Biological chemistry.

Chartier-Harlin, M. C., F. Crawford, K. Hamandi, M. Mullan, A. Goate, J. Hardy, H. Backhovens, J. J. Martin and C. V. Broeckhoven (1991). Screening for the beta-amyloid precursor protein mutation (APP717: Val----Ile) in extended pedigrees with early onset Alzheimer's disease. Neurosci Lett. **129:** 134-5.

Cho, J.-H. and G. V. W. Johnson (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. J Neurochem. **88:** 349-58.

Chung, C. W., Y. H. Song, I. K. Kim, W. J. Yoon, B. R. Ryu, D. G. Jo, H. N. Woo, Y. K. Kwon, H. H. Kim, B. J. Gwag, I. H. Mook-Jung and Y. K. Jung (2001). Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3. Neurobiology of Disease. **8:** 162-72.

Chung, E., Y. Ji, Y. Sun, R. J. Kascsak, R. B. Kascsak, P. D. Mehta, S. M. Strittmatter and T. Wisniewski (2010). Anti-PrPC monoclonal antibody infusion as a novel treatment for cognitive deficits in an Alzheimer's disease model mouse. BMC Neurosci. **11:** 130.

Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George Hyslop and D. J. Selkoe (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. Nat Med. **3:** 67-72.

Citron, M. (2010). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. Nat Rev Drug Discov. **9:** 387-98.

Clavaguera, F., T. Bolmont, R. A. Crowther, D. Abramowski, S. Frank, A. Probst, G. Fraser, A. K. Stalder, M. Beibel, M. Staufenbiel, M. Jucker, M. Goedert and M. Tolnay (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. Nat Cell Biol. **11:** 909-13.

Cohen, T. J., J. L. Guo, D. E. Hurtado, L. K. Kwong, I. P. Mills, J. Q. Trojanowski and V. M. Y. Lee (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. Nat Commun. **2:** 252.

Cribbs, D. H., A. Ghochikyan, V. Vasilevko, M. Tran, I. Petrushina, N. Sadzikava, D. Babikyan, P. Kesslak, T. Kieber-Emmons, C. W. Cotman and M. G. Agadjanyan (2003). Adjuvant-dependent modulation of Th1 and Th2 responses to immunization with beta-amyloid. Int Immunol. **15:** 505-14.

Cruz, J. C., H.-C. Tseng, J. A. Goldman, H. Shih and L.-H. Tsai (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. Neuron. **40:** 471-83.

Cuchillo-Ibanez, I., A. Seereeram and H. Byers (2008). Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. The FASEB Journal.

D

D'abramo, C., C. Acker and P. Davies (2011). Passive immunization of P301L mice with two different tau monoclonal antibodies. Alzheimer's & Dementia. **7:** 481.

Das, P., V. Howard, N. Loosbrock, D. Dickson, M. P. Murphy and T. E. Golde (2003). Amyloid-beta immunization effectively reduces amyloid deposition in FcRgamma-/- knock-out mice. J Neurosci. **23:** 8532-8.

DaSilva, K., M. E. Brown, D. Westaway and J. McLaurin (2006). Immunization with amyloid-beta using GM-CSF and IL-4 reduces amyloid burden and alters plaque morphology. Neurobiology of Disease. **23:** 433-44.

Davis, D. R., B. H. Anderton, J. P. Brion, C. H. Reynolds and D. P. Hanger (1997). Oxidative stress induces dephosphorylation of tau in rat brain primary neuronal cultures. J Neurochem. **68:** 1590-7.

De Calignon, A., L. M. Fox, R. Pitstick, G. A. Carlson, B. J. Bacskai, T. L. Spires-Jones and B. T. Hyman (2010). Caspase activation precedes and leads to tangles. Nature. **464:** 1201-4.

Deane, R., A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, B. LaRue, H. Guo, Z. Wu, D. M. Holtzman and B. V. Zlokovic (2005). IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. J Neurosci. **25:** 11495-503.

Defebvre, L. (2010). [Parkinson's disease: Role of genetic and environment factors. Involvement in everyday clinical practice]. Rev Neurol (Paris). **166:** 764-9.

Delacourte, A., J. P. David, N. Sergeant, L. Buée, A. Wattez, P. Vermersch, F. Ghozali, C. Fallet-Bianco, F. Pasquier, F. Lebert, H. Petit and C. Di Menza (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. Neurology. **52:** 1158-65.

DeMattos, R. B., K. R. Bales, D. J. Cummins, J. C. Dodart, S. M. Paul and D. M. Holtzman (2001). Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. **98:** 8850-5.

Denk, F. and R. Wade-Martins (2009). Knock-out and transgenic mouse models of tauopathies. Neurobiol Aging. **30:** 1-13.

Derecki, N. C., A. N. Cardani, C. H. Yang, K. M. Quinnies, A. Crihfield, K. R. Lynch and J. Kipnis (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. J Exp Med. **207:** 1067-80.

Derkinderen, P., T. M. E. Scales, D. P. Hanger, K.-Y. Leung, H. L. Byers, M. A. Ward, C. Lenz, C. Price, I. N. Bird, T. Perera, S. Kellie, R. Williamson, W. Noble, R. A. Van Etten, K. Leroy, J.-P. Brion, C. H. Reynolds and B. H. Anderton (2005). Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. J Neurosci. **25:** 6584-93.

Deters, N., L. M. Ittner and J. Götz (2008). Divergent phosphorylation pattern of tau in P301L tau transgenic mice. Eur J Neurosci. **28:** 137-47.

Deters, N., L. M. Ittner and J. Götz (2009). Substrate-specific reduction of PP2A activity exaggerates tau pathology. Biochemical and Biophysical Research Communications. **379:** 400-5.

Dickey, C. A. (2006). HSP induction mediates selective clearance of tau phosphorylated at proline-directed Ser/Thr sites but not KXGS (MARK) sites. The FASEB Journal**:** 1-3.

Dickey, C. A., A. Kamal, K. Lundgren, N. Klosak, R. M. Bailey, J. Dunmore, P. Ash, S. Shoraka, J. Zlatkovic and C. B. Eckman (2007a). The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. Journal of Clinical Investigation. **117:** 648.

Dickey, C. A., C. Patterson, D. Dickson and L. Petrucelli (2007b). Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease. Trends Mol Med. **13:** 32-8.

Divinski, I., M. Holtser-Cochav, I. Vulih-Schultzman, R. A. Steingart and I. Gozes (2006). Peptide neuroprotection through specific interaction with brain tubulin. J Neurochem. **98:** 973-84.

Dixit, R., J. L. Ross, Y. E. Goldman and E. L. F. Holzbaur (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. Science. **319:** 1086-9.

Dodart, J.-C., K. R. Bales, K. S. Gannon, S. J. Greene, R. B. DeMattos, C. Mathis, C. A. DeLong, S. Wu, X. Wu, D. M. Holtzman and S. M. Paul (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model. Nat Neurosci. **5:** 452-7.

Dodel, R., F. Neff, C. Noelker, R. Pul, Y. Du, M. Bacher and W. Oertel (2010). Intravenous immunoglobulins as a treatment for Alzheimer's disease: rationale and current evidence. Drugs. **70:** 513-28.

Dodel, R. C., Y. Du, C. Depboylu, H. Hampel, L. Frölich, A. Haag, U. Hemmeter, S. Paulsen, S. J. Teipel, S. Brettschneider, A. Spottke, C. Nölker, H. J. Möller, X. Wei, M. Farlow, N. Sommer and W. H. Oertel (2004). Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatr. **75:** 1472-4.

Drechsel, D. N., A. A. Hyman, M. H. Cobb and M. W. Kirschner (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. Mol Biol Cell. **3:** 1141-54.

Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (1995). Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. J Biol Chem. **270:** 7679-88.

Du, Y., X. Wei, R. Dodel, N. Sommer, H. Hampel, F. Gao, Z. Ma, L. Zhao, W. H. Oertel and M. Farlow (2003). Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. Brain. **126:** 1935-9.

Duyckaerts, C., M. Bennecib, Y. Grignon, T. Uchihara, Y. He, F. Piette and J. J. Hauw (1997). Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. Neurobiol Aging. **18:** 267-73.

E

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

Edison, P., D. Brooks, J. Rinne, R. Perry, G. Gelosa and S. R. M. d. Liano (2011). Amyloid imaging in atypical dementia using 11C-PIB PET. Alzheimer's & Dementia. **7:** 108-109.

Ekinci, F. J. and T. B. Shea (2000). Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane. Cell Mol Neurobiol. **20:** 497-508.

Emadi, S., R. Liu, B. Yuan, P. Schulz, C. McAllister, Y. Lyubchenko, A. Messer and M. R. Sierks (2004). Inhibiting aggregation of alpha-synuclein with human single chain antibody fragments. Biochemistry. **43:** 2871-8.

Enari, M., E. Flechsig and C. Weissmann (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. Proc Natl Acad Sci USA. **98:** 9295-9.

Engelhardt, B. (2008). The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. Curr Pharm Des. **14:** 1555-65.

Etienne-Manneville, S., J. B. Manneville, P. Adamson, B. Wilbourn, J. Greenwood and P. O. Couraud (2000). ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. J Immunol. **165:** 3375-83.

F

Fabian, R. H. (1990). Uptake of antineuronal IgM by CNS neurons: comparison with antineuronal IgG. Neurology. **40:** 419-22.

Feraudet, C. (2005). Screening of 145 Anti-PrP Monoclonal Antibodies for Their Capacity to Inhibit PrPSc Replication in Infected Cells. Journal of Biological Chemistry. **280:** 11247-11258.

Féraudet-Tarisse, C., O. Andréoletti, N. Morel, S. Simon, C. Lacroux, J. Mathey, P. Lamourette, A. Relaño, J. M. Torres, C. Créminon and J. Grassi (2010). Immunotherapeutic effect of anti-PrP monoclonal antibodies in transmissible spongiform encephalopathy mouse models: pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis. J Gen Virol. **91:** 1635-45.

Ferrari, A., F. Hoerndli, T. Baechi, R. M. Nitsch and J. Götz (2003). beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. J Biol Chem. **278:** 40162-8.

Ferrer, I., M. Boada Rovira, M. L. Sánchez Guerra, M. J. Rey and F. Costa-Jussá (2004). Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. Brain Pathol. **14:** 11-20.

Feuillette, S., L. Miguel, T. Frébourg, D. Campion and M. Lecourtois (2010). Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. J Neurochem. **113:** 895-903.

Frank, R. T., K. S. Aboody and J. Najbauer (2011). Strategies for enhancing antibody delivery to the brain. Biochimica et biophysica acta. **1816(2):** 191-198.

Frenkel, D., O. Katz and B. Solomon (2000). Immunization against Alzheimer's beta -amyloid plaques via EFRH phage administration. Proc Natl Acad Sci USA. **97:** 11455-9.

Frenkel, D., N. Kariv and B. Solomon (2001). Generation of auto-antibodies towards Alzheimer's disease vaccination. Vaccine. **19:** 2615-9.

Frost, B., R. L. Jacks and M. I. Diamond (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. J Biol Chem. **284:** 12845-52.

Fu, A., Q.-H. Zhou, E. K.-W. Hui, J. Z. Lu, R. J. Boado and W. M. Pardridge (2010). Intravenous treatment of experimental Parkinson's disease in the mouse with an IgG-GDNF fusion protein that penetrates the blood-brain barrier. Brain Res. **1352:** 208-13.

G

Gabathuler, R. (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. Neurobiology of Disease. **37:** 48-57.

Gadad, B. S., G. B. Britton and R. Ks (2011). Targeting Oligomers in Neurodegenerative Disorders: Lessons from α-Synuclein, Tau, and Amyloid-β Peptide. J Alzheimers Dis. **24:** 1-10.

Galas, M.-C., P. Dourlen, S. Bégard, K. Ando, D. Blum, M. Hamdane and L. Buée (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. J Biol Chem. **281:** 19296-304.

Gamblin, T. C., F. Chen, A. Zambrano, A. Abraha, S. Lagalwar, A. L. Guillozet, M. Lu, Y. Fu, F. Garcia-Sierra, N. LaPointe, R. Miller, R. W. Berry, L. I. Binder and V. L. Cryns (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA. **100:** 10032-7.

García-Sierra, F., S. Mondragón-Rodríguez and G. Basurto-Islas (2008). Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. **14:** 401-9.

Gendron, T. F. and L. Petrucelli (2009). The role of tau in neurodegeneration. Mol Neurodegener. **4:** 13.

Genin, E., D. Hannequin, D. Wallon, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, M. J. Bullido, S. Engelborghs, P. De Deyn, C. Berr, F. Pasquier, B. Dubois, G. Tognoni, N. Fiévet, N. Brouwers, K. Bettens, B. Arosio, E. Coto, M. Del Zompo, I. Mateo, J. Epelbaum, A. Frank-Garcia, S. Helisalmi, E. Porcellini, A. Pilotto, P. Forti, R. Ferri, E. Scarpini, G. Siciliano, V. Solfrizzi, S. Sorbi, G. Spalletta, F. Valdivieso, S. Vepsäläinen, V. Alvarez, P. Bosco, M. Mancuso, F. Panza, B. Nacmias, P. Bossù, O. Hanon, P.

Piccardi, G. Annoni, D. Seripa, D. Galimberti, F. Licastro, H. Soininen, J.-F. Dartigues, M. I. Kamboh, C. Van Broeckhoven, J. C. Lambert, P. Amouyel and D. Campion (2011). APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. Molecular psychiatry. **16:** 903-907.

Ghochikyan, A. (2009). Rationale for peptide and DNA based epitope vaccines for Alzheimer's disease immunotherapy. CNS Neurol Disord Drug Targets. **8:** 128-43.

Gilman, S., M. Koller, R. S. Black, L. Jenkins, S. G. Griffith, N. C. Fox, L. Eisner, L. Kirby, M. B. Rovira, F. Forette, J.-M. Orgogozo and A. Q.-.-S. Team (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. Neurology. **64:** 1553-62.

Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. Biochemical and Biophysical Research Communications. **120:** 885-90.

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

Goedert, M., M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich and R. A. Crowther (1989b). 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. EMBO J. **8:** 393-9.

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

Goedert, M., R. Jakes, Z. Qi, J. H. Wang and P. Cohen (1995). Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. J Neurochem. **65:** 2804-7.

Goedert, M. and M. G. Spillantini (2000). Tau mutations in frontotemporal dementia FTDP-17 and their relevance for Alzheimer's disease. Biochimica et biophysica acta. **1502:** 110-21.

Goedert, M., F. Clavaguera and M. Tolnay (2010). The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. Trends Neurosci. **33(7):** 317-25.

Golde, T. E., P. Das and Y. Levites (2009). Quantitative and mechanistic studies of Abeta immunotherapy. CNS Neurol Disord Drug Targets. **8:** 31-49.

Goldman, S. D. B. and J. P. Krise (2010). Niemann-Pick C1 functions independently of Niemann-Pick C2 in the initial stage of retrograde transport of membrane-impermeable lysosomal cargo. J Biol Chem. **285:** 4983-94.

Gong, C.-X., F. Liu, G. Wu, S. Rossie, J. Wegiel, L. Li, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2004). Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. J Neurochem. **88:** 298-310.

Goñi, F., E. Knudsen, F. Schreiber, H. Scholtzova, J. Pankiewicz, R. Carp, H. C. Meeker, R. Rubenstein, D. R. Brown, M.-S. Sy, J. A. Chabalgoity, E. M. Sigurdsson and T. Wisniewski (2005). Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. Neuroscience. **133:** 413-21.

Goñi, F., F. Prelli, F. Schreiber, H. Scholtzova, E. Chung, R. Kascsak, D. R. Brown, E. M. Sigurdsson, J. A. Chabalgoity and T. Wisniewski (2008). High titers of mucosal and systemic anti-PrP antibodies abrogate oral prion infection in mucosal-vaccinated mice. Neuroscience. **153:** 679-86.

Gorlovoy, P., S. Larionov, T. T. H. Pham and H. Neumann (2009). Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators. The FASEB Journal. **23:** 2502-13.
Götz, J. and L. M. Ittner (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. Nat Rev Neurosci. **9:** 532-44.
Gourdain, P., S. Grégoire, S. Iken, V. Bachy, G. Dorban, T. Chaigneau, H. Debiec, A.-S. Bergot, I. Renault, P. Aucouturier and C. Carnaud (2009). Adoptive transfer of T lymphocytes sensitized against the prion protein attenuates prion invasion in scrapie-infected mice. J Immunol. **183:** 6619-28.
Gozes, I., A. Stewart, B. Morimoto, A. Fox, K. Sutherland and D. Schmeche (2009). Addressing Alzheimer's Disease Tangles: From NAP to AL-108. Current Alzheimer research. **6:** 455-460

Greenberg, S. G., P. Davies, J. D. Schein and L. I. Binder (1992). Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. J Biol Chem. **267:** 564-9.
Greenwood, J., C. L. Amos, C. E. Walters, P.-O. Couraud, R. Lyck, B. Engelhardt and P. Adamson (2003). Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. J Immunol. **171:** 2099-108.
Grueninger, F., B. Bohrmann, C. Czech, T. M. Ballard, J. R. Frey, C. Weidensteiner, M. von Kienlin and L. Ozmen (2010). Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by Abeta in TauPS2APP triple transgenic mice. Neurobiology of Disease. **37:** 294-306.
Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski and L. I. Binder (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. Proc Natl Acad Sci USA. **83:** 4913-7.
Gu, J. and E. M. Sigurdsson (2011). Immunotherapy for Tauopathies. J Mol Neurosci.
Gu, Y., F. Oyama and Y. Ihara (1996). Tau is widely expressed in rat tissues. J Neurochem. **67:** 1235-44.
Guillozet-Bongaarts, A. L., K. E. Glajch, E. G. Libson, M. E. Cahill, E. Bigio, R. W. Berry and L. I. Binder (2007). Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. Acta Neuropathol. **113:** 513-20.
Guo, J. L. and V. M. Y. Lee (2011). Seeding of normal tau by pathological tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. J Biol Chem.
Gustke, N., B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (1994). Domains of tau protein and interactions with microtubules. Biochemistry. **33:** 9511-22.

H

Haase, C., J. T. Stieler, T. Arendt and M. Holzer (2004). Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. J Neurochem. **88:** 1509-20.
Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat Rev Mol Cell Biol. **8:** 101-12.
Hamano, T., T. F. Gendron, E. Causevic, S.-H. Yen, W.-L. Lin, C. Isidoro, M. Deture and L.-W. Ko (2008). Autophagic-lysosomal pertubation enhances tau aggregation in transfectanbts with induced wild-type tau expression. Eur J Neurosci. **27:** 1119-1130.
Hamdane, M., P. Dourlen, A. Bretteville, A.-V. Sambo, S. Ferreira, K. Ando, O. Kerdraon, S. Bégard, L. Geay, G. Lippens, N. Sergeant, A. Delacourte, C.-A. Maurage, M.-C. Galas and L. Buée (2006). Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells. Mol Cell Neurosci. **32:** 155-60.

Hanger, D. P., K. Hughes, J. R. Woodgett, J. P. Brion and B. H. Anderton (1992). Glycogen synthase kinase-3 induces Alzheimer's disease-like phosphorylation of tau: generation of paired helical filament epitopes and neuronal localisation of the kinase. Neurosci Lett. **147:** 58-62.

Hanger, D. P. and S. Wray (2010). Tau cleavage and tau aggregation in neurodegenerative disease. Biochem Soc Trans. **38:** 1016-20.

Hara, J. and W. Shankle (2011). Long-Term IVIg treatment delays progression of Alzheimer's and lewy body disease. Alzheimer's & Dementia. **7:** 461

Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda and N. Hirokawa (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. Nature. **369:** 488-91.

Hardy, J. (1997). The Alzheimer family of diseases: many etiologies, one pathogenesis? Proc Natl Acad Sci USA. **94:** 2095-7.

Hardy, J. and D. Allsop (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. Trends in Pharmacological Sciences. **12:** 383-8.

Hasegawa, M. (2006). Biochemistry and molecular biology of tauopathies. Neuropathology. **26:** 484-90.

Hasegawa, M., R. Jakes, R. A. Crowther, V. M. Lee, Y. Ihara and M. Goedert (1996). Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. FEBS Lett. **384:** 25-30.

Hatters, D. M. (2008). Protein misfolding inside cells: the case of huntingtin and Huntington's disease. IUBMB Life. **60:** 724-8.

Heppner, F. L. and A. Aguzzi (2004). Recent developments in prion immunotherapy. Curr Opin Immunol. **16:** 594-8.

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

Hirokawa, N., Y. Noda and Y. Okada (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division. Curr Opin Cell Biol. **10:** 60-73.

Hirokawa, N., Y. Shiomura and S. Okabe (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. J Cell Biol. **107:** 1449-59.

Hock, C., U. Konietzko, A. Papassotiropoulos, A. Wollmer, J. Streffer, R. C. von Rotz, G. Davey, E. Moritz and R. M. Nitsch (2002). Generation of antibodies specific for beta-amyloid by vaccination of patients with Alzheimer disease. Nat Med. **8:** 1270-5.

Hoffmann, R., V. M. Lee, S. Leight, I. Varga and L. Otvos (1997). Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. Biochemistry. **36:** 8114-24.

Hollingworth, S. A. and G. J. Byrne (2011). Prescribing trends in cognition enhancing drugs in Australia. Int Psychogeriatr. **23:** 238-45.

Horiguchi, T., K. Uryu, B. I. Giasson, H. Ischiropoulos, R. LightFoot, C. Bellmann, C. Richter-Landsberg, V. M.-Y. Lee and J. Q. Trojanowski (2003). Nitration of tau protein is linked to neurodegeneration in tauopathies. The American Journal of Pathology. **163:** 1021-31.

Hua, Q., R. Q. He, N. Haque, M. H. Qu, A. del Carmen Alonso, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. Cell Mol Life Sci. **60:** 413-21.

I

Ikeda, M., M. Shoji, T. Kawarai, T. Kawarabayashi, E. Matsubara, T. Murakami, A. Sasaki, Y. Tomidokoro, Y. Ikarashi, H. Kuribara, K. Ishiguro, M. Hasegawa, S.-H. Yen, M. A. Chishti, Y. Harigaya, K. Abe, K. Okamoto, P. St George-Hyslop and D. Westaway (2005). Accumulation of filamentous tau in the cerebral cortex of human tau R406W transgenic mice. The American Journal of Pathology. **166:** 521-31.

Iken, S., V. Bachy, P. Gourdain, A. Lim, S. Grégoire, T. Chaigneau, P. Aucouturier and C. Carnaud (2011). Th2-polarised PrP-specific Transgenic T-cells Confer Partial Protection against Murine Scrapoie. PLoS pathogens **7(9):** e1002216.

Imamura, K., M. Sawada, N. Ozaki, H. Naito, N. Iwata, R. Ishihara, T. Takeuchi and H. Shibayama (2001). Activation mechanism of brain microglia in patients with diffuse neurofibrillary tangles with calcification: a comparison with Alzheimer disease. Alzheimer Dis Assoc Disord. **15:** 45-50.

Ishiguro, K., A. Shiratsuchi, S. Sato, A. Omori, M. Arioka, S. Kobayashi, T. Uchida and K. Imahori (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. FEBS Lett. **325:** 167-72.

Ishizawa, K. and D. W. Dickson (2001). Microglial activation parallels system degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. J Neuropathol Exp Neurol. **60:** 647-57.

J

Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J Neurol Neurosurg Psychiatr. **79:** 368-76.

Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, P. Horne, D. Heslin, J. French, H. T. Mount, R. A. Nixon, M. Mercken, C. Bergeron, P. E. Fraser, P. St George-Hyslop and D. Westaway (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. Nature. **408:** 979-82.

Jennings, G. T. and M. F. Bachmann (2008). The coming of age of virus-like particle vaccines. Biol Chem. **389:** 521-36.

Jeugd, A. V., T. Ahmed, S. Burnouf, K. Belarbi, M. Hamdame, M. E. Grosjean, S. Humez, D. Balschun, D. Blum and L. Buée (2011). Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission Neurobiology of Learning and Memory. **95:** 296-304.

Jicha, G. A., R. Bowser, I. G. Kazam and P. Davies (1997a). Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. J Neurosci Res. **48:** 128-32.

Jicha, G. A., E. Lane, I. Vincent, L. Otvos, R. Hoffmann and P. Davies (1997b). A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. J Neurochem. **69:** 2087-95.

Johnson, G. V. W. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. J Cell Sci. **117:** 5721-5729.

Jucker, M. and L. C. Walker (2011). Pathogenic Protein seeding in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. Annals of Neurology.

K

Kalbfuss, B. (2001). Correction of alternative splicing of Tau in frontotemporal dementia of parkinsonism linked to chromosome 17. Journal of Biological Chemistry. **276:** 42986-42993.

Kerchner, G. A. and A. L. Boxer (2010). Bapineuzumab. Expert Opin Biol Ther. **10:** 1121-30.

Khurana, V., I. Elson-Schwab, T. A. Fulga, K. A. Sharp, C. A. Loewen, E. Mulkearns, J. Tyynelä, C. R. Scherzer and M. B. Feany (2010). Lysosomal dysfunction promotes cleavage and neurotoxicity of tau in vivo. PLoS Genet. **6:** e1001026.

Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. Nature. **197:** 192-3.

Kim, C.-L., A. Karino, N. Ishiguro, M. Shinagawa, M. Sato and M. Horiuchi (2004). Cell-surface retention of PrPC by anti-PrP antibody prevents protease-resistant PrP formation. J Gen Virol. **85:** 3473-82.

Kim, H.-D., Y. Cao, F.-K. Kong, K. R. Van Kampen, T. L. Lewis, Z. Ma, D.-c. C. Tang and K.-i. Fukuchi (2005). Induction of a Th2 immune response by co-administration of recombinant adenovirus vectors encoding amyloid beta-protein and GM-CSF. Vaccine. **23:** 2977-86.

Kim, H.-Y., M.-K. Cho, A. Kumar, E. Maier, C. Siebenhaar, S. Becker, C. O. Fernandez, H. A. Lashuel, R. Benz, A. Lange and M. Zweckstetter (2009). Structural properties of pore-forming oligomers of alpha-synuclein. J Am Chem Soc. **131:** 17482-9.

Kim, S.-I., W.-K. Lee, S.-S. Kang, S.-Y. Lee, M.-J. Jeong, H. J. Lee, S.-S. Kim, G. V. W. Johnson and W. Chun (2011). Suppression of autophagy and activation of glycogen synthase kinase 3beta facilitate the aggregate formation of tau. Korean J Physiol Pharmacol. **15:** 107-14.

Kins, S., A. Crameri, D. R. Evans, B. A. Hemmings, R. M. Nitsch and J. Gotz (2001). Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. J Biol Chem. **276:** 38193-200.

Klebanoff, C. A., N. Acquavella, Z. Yu and N. P. Restifo (2011). Therapeutic cancer vaccines: are we there yet? Immunol Rev. **239:** 27-44.

Köhler, G. and C. Milstein (1992). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. Biotechnology. **24:** 524-6.

Kondo, M., T. Tokuda, T. Kasai, Y. Oishi, S. Ataka, H. Shimada, T. Miki, H. Mori and M. Nakagawa (2011). Intravenous immunoglobulin improved cognitive functions in patients with Alzheimer's disease without any changes in PIB retention in the brain. Alzheimer's & Dementia. **7:** 791.

Köpke, E., Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal and I. Grundke-Iqbal (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. J Biol Chem. **268:** 24374-84.

Kotilinek, L. A., B. Bacskai, M. Westerman, T. Kawarabayashi, L. Younkin, B. T. Hyman, S. Younkin and K. H. Ashe (2002). Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. J Neurosci. **22:** 6331-5.

Kounnas, M. Z., R. D. Moir, G. W. Rebeck, A. I. Bush, W. S. Argraves, R. E. Tanzi, B. T. Hyman and D. K. Strickland (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. Cell. **82:** 331-40.

Kovac, A., N. Zilka, Z. Kazmerova, M. Cente, M. Zilkova and M. Novak (2011). Misfolded Truncated Protein {tau} Induces Innate Immune Response via MAPK Pathway. J Immunol. **187(5):** 2732-39.

Kovac, A., M. Zilkova, M. A. Deli, N. Zilka and M. Novak (2009). Human truncated tau is using a different mechanism from amyloid-beta to damage the blood-brain barrier. J Alzheimers Dis. **18:** 897-906.

Krishnamurthy, P. K., R. Sait, H. Banu, A. Boutajangout and E. M. Sigurdsson (2009). Immunotherapy targeting Alzheimer's phospho-tau epitope within the microtubule binding region of tau clears pathological tau and prevents functional decline in a

mouse model of tauopathy. Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association **5:** P112-P112.
Ksiezak-Reding, H., W. K. Liu and S. H. Yen (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. Brain Res. **597:** 209-19.
Kuhla, B., C. Haase, K. Flach, H.-J. Lüth, T. Arendt and G. Münch (2007). Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. J Biol Chem. **282:** 6984-91.

L

LaPointe, N. E., G. Morfini, G. Pigino, I. N. Gaisina, A. P. Kozikowski, L. I. Binder and S. T. Brady (2009). The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. J Neurosci Res. **87:** 440-51.
Lasagna-Reeves, C. A., D. L. Castillo-Carranza, U. Sengupta, A. L. Clos, G. R. Jackson and R. Kayed (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. Mol Neurodegener. **6:** 39.
Laurie, C., A. Reynolds, O. Coskun, E. Bowman, H. E. Gendelman and R. L. Mosley (2007). CD4+ T cells from Copolymer-1 immunized mice protect dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. Journal of Neuroimmunology. **183:** 60-8.
Le Corre, S., H. W. Klafki, N. Plesnila, G. Hübinger, A. Obermeier, H. Sahagún, B. Monse, P. Seneci, J. Lewis, J. Eriksen, C. Zehr, M. Yue, E. McGowan, D. W. Dickson, M. Hutton and H. M. Roder (2006). An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. **103:** 9673-8.
Lee, D. C., J. Rizer, M.-L. B. Selenica, P. Reid, C. Kraft, A. Johnson, L. Blair, M. N. Gordon, C. A. Dickey and D. Morgan (2010). LPS- induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice. J Neuroinflammation. **7:** 56.
Lee, G. (2005). Tau and src family tyrosine kinases. Biochimica et biophysica acta. **1739:** 323-30.
Lee, G., S. T. Newman, D. L. Gard, H. Band and G. Panchamoorthy (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. J Cell Sci. **111:** 3167.
Lee, J. J. and S. M. Swain (2006). Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. J Clin Oncol. **24:** 1633-42.
Lee, S.-J., P. Desplats, C. Sigurdson, I. Tsigelny and E. Masliah (2010). Cell-to-cell transmission of non-prion protein aggregates. Nat Rev Neurol. **6:** 702-6.
Lee, S.-J., H.-S. Lim, E. Masliah and H.-J. Lee (2011). Protein aggregate spreading in neurodegenerative diseases: Problems and perspectives. Neurosci Res.
Lee, V. M., M. Goedert and J. Q. Trojanowski (2001). Neurodegenerative tauopathies. Annu Rev Neurosci. **24:** 1121-59.
Lemere, C. A., R. Maron, D. J. Selkoe and H. L. Weiner (2001). Nasal vaccination with beta-amyloid peptide for the treatment of Alzheimer's disease. DNA Cell Biol. **20:** 705-11.
Lemere, C. A. (2009). Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. Prog Brain Res. **175:** 83-93.
Lemere, C. A. and E. Masliah (2010). Can Alzheimer disease be prevented by amyloid-b immunotherapy? Nat Rev Neurol. **6:** 108-119.
Levites, Y., L. A. Smithson, R. W. Price, R. S. Dakin, B. Yuan, M. R. Sierks, J. Kim, E. McGowan, D. K. Reed, T. L. Rosenberry, P. Das and T. E. Golde (2006). Insights into

the mechanisms of action of anti-Abeta antibodies in Alzheimer's disease mouse models. The FASEB Journal. **20:** 2576-8.
Levy-Lahad, E., A. Lahad, E. M. Wijsman, T. D. Bird and G. D. Schellenberg (1995). Apolipoprotein E genotypes and age of onset in early-onset familial Alzheimer's disease. Ann Neurol. **38:** 678-80.
Lewis, J., E. McGowan, J. Rockwood, H. Melrose, P. Nacharaju, M. Van Slegtenhorst, K. Gwinn-Hardy, M. Paul Murphy, M. Baker, X. Yu, K. Duff, J. Hardy, A. Corral, W. L. Lin, S. H. Yen, D. W. Dickson, P. Davies and M. Hutton (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. Nat Genet. **25:** 402-5.
Li, L., S. Napper and N. R. Cashman (2010). Immunotherapy for prion diseases: opportunities and obstacles. Immunotherapy. **2:** 269-82.
Lindwall, G. and R. D. Cole (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. J Biol Chem. **259:** 5301-5.
Liu, F., K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal and C.-X. Gong (2002a). Involvement of aberrant glycosylation in phosphorylation of tau by cdk5 and GSK-3beta. FEBS Lett. **530:** 209-14.
Liu, F., T. Zaidi, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, R. K. Merkle and C. X. Gong (2002b). Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. FEBS Lett. **512:** 101-6.
Liu, F., I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal and C.-X. Gong (2005). Contribution of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. Eur J Neurosci. **22:** 1942-50.
Liu, F., B. Li, E.-J. Tung, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal and C.-X. Gong (2007). Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation. Eur J Neurosci. **26:** 3429-36.
Liu, F., J. Shi, H. Tanimukai, J. Gu, J. Gu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal and C.-X. Gong (2009). Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. Brain. **132:** 1820-32.
Liu, Y.-J., D.-W. Guo, L. Tian, D.-S. Shang, W.-D. Zhao, B. Li, W.-G. Fang, L. Zhu and Y.-H. Chen (2010). Peripheral T cells derived from Alzheimer's disease patients overexpress CXCR2 contributing to its transendothelial migration, which is microglial TNF-alpha-dependent. Neurobiol Aging. **31:** 175-88.
Lombard, M., P. P. Pastoret and A. M. Moulin (2007). A brief history of vaccines and vaccination. Rev - Off Int Epizoot. **26:** 29-48.
Lu, P. J., G. Wulf, X. Z. Zhou, P. Davies and K. P. Lu (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. Nature. **399:** 784-8.
Luo, W., F. Dou, A. Rodina, S. Chip, J. Kim, Q. Zhao, K. Moulick, J. Aguirre, N. Wu, P. Greengard and G. Chiosis (2007). Roles of heat-shock protein 90 in maintaining and facilitating the neurodegenerative phenotype in tauopathies. Proc Natl Acad Sci USA. **104:** 9511-6.

M

Maas, T., J. Eidenmüller and R. Brandt (2000). Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. J Biol Chem. **275:** 15733-40.
Maeda, S., N. Sahara, Y. Saito, M. Murayama, Y. Yoshiike, H. Kim, T. Miyasaka, S. Murayama, A. Ikai and A. Takashima (2007). Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. Biochemistry. **46:** 3856-61.

Mailliot, C., T. Bussière, M. L. Caillet-Boudin, A. Delacourte and L. Buée (1998). Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation. Neurosci Lett. **255:** 13-6.

Man, S.-M., Y.-R. Ma, D.-S. Shang, W.-D. Zhao, B. Li, D.-W. Guo, W.-G. Fang, L. Zhu and Y.-H. Chen (2007). Peripheral T cells overexpress MIP-1alpha to enhance its transendothelial migration in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging. **28:** 485-96.

Mandelkow, E.-M., K. Stamer, R. Vogel, E. Thies and E. Mandelkow (2003). Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. Neurobiol Aging. **24:** 1079-85.

Mangialasche, F., A. Solomon, B. Winblad, P. Mecocci and M. Kivipelto (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. Lancet Neurol. **9:** 702-16.

Martin, L., X. Latypova and F. Terro (2011). Post-translational modifications of tau protein : Implications for Alzheimer's disease. Neurochemistry International. **58:** 458-71.

Masliah, E., L. Hansen, A. Adame, L. Crews, F. Bard, C. Lee, P. Seubert, D. Games, L. Kirby and D. Schenk (2005a). Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. Neurology. **64:** 129-31.

Masliah, E., E. Rockenstein, A. Adame, M. Alford, L. Crews, M. Hashimoto, P. Seubert, M. Lee, J. Goldstein, T. Chilcote, D. Games and D. Schenk (2005b). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. Neuron. **46:** 857-68.

Masliah, E., E. Rockenstein, M. Mante, L. Crews, B. Spencer, A. Adame, C. Patrick, M. Trejo, K. Ubbi, T. T. Rohn, S. Mueller-Steiner, P. Seubert, R. Barbour, L. McConlogue, M. Buttini, D. Games and D. Schenk (2011). Passive Immunization Reduces Behavioral and Neuropathological Deficits in an Alpha-Synuclein Transgenic Model of Lewy Body Disease. PLoS ONE. **6:** e19338.

Matsuoka, Y., A. J. Gray, C. Hirata-Fukae, S. S. Minami, E. G. Waterhouse, M. P. Mattson, F. M. LaFerla, I. Gozes and P. S. Aisen (2007). Intranasal NAP administration reduces accumulation of amyloid peptide and tau hyperphosphorylation in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease at early pathological stage. Journal of Molecular Neuroscience. **31:** 165-170.

Matsuoka, Y., Y. Jouroukhin, A. J. Gray, L. Ma, C. Hirata-Fukae, H.-F. Li, L. Feng, L. Lecanu, B. R. Walker, E. Planel, O. Arancio, I. Gozes and P. S. Aisen (2008). A neuronal microtubule-interacting agent, NAPVSIPQ, reduces tau pathology and enhances cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Ther. **325:** 146-53.

Mattson, M. P. (1997). Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. Physiol Rev. **77:** 1081-132.

Maurage, C. A., B. Udd, M. M. Ruchoux, P. Vermersch, H. Kalimo, R. Krahe, A. Delacourte and N. Sergeant (2005). Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease. Neurology. **65:** 1636-8.

Mayeux, R., Y. Stern, R. Ottman, T. K. Tatemichi, M. X. Tang, G. Maestre, C. Ngai, B. Tycko and H. Ginsberg (1993). The apolipoprotein epsilon 4 allele in patients with Alzheimer's disease. Ann Neurol. **34:** 752-4.

McQuillan, K., M. A. Lynch and K. H. G. Mills (2010). Activation of mixed glia by Abeta-specific Th1 and Th17 cells and its regulation by Th2 cells. Brain Behav Immun. **24:** 598-607.

Medina, M. (2011). Recent developments in tau-based therapeutics for neurodegenerative diseases. Recent Pat CNS Drug Discov. **6:** 20-30.

Meraz-Ríos, M. A., K. I. Lira-De León, V. Campos-Peña, M. A. De Anda-Hernández and R. Mena-López (2010). Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. J Neurochem. **112:** 1353-67.

Messer, A., S. M. Lynch and D. C. Butler (2009). Developing intrabodies for the therapeutic suppression of neurodegenerative pathology. Expert Opin Biol Ther. **9:** 1189-97.
Miao, Y., J. Chen, Q. Zhang and A. Sun (2010). Deletion of tau attenuates heat shock-induced injury in cultured cortical neurons. J Neurosci Res. **88:** 102-10.
Miller, T. W., T. L. Shirley, W. J. Wolfgang, X. Kang and A. Messer (2003). DNA vaccination against mutant huntingtin ameliorates the HDR6/2 diabetic phenotype. Mol Ther. **7:** 572-9.
Min, S.-W., S.-H. Cho, Y. Zhou, S. Schroeder, V. Haroutunian, W. W. Seeley, E. J. Huang, Y. Shen, E. Masliah, C. Mukherjee, D. Meyers, P. A. Cole, M. Ott and L. Gan (2010). Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. Neuron. **67:** 953-66.
Minami, S. S., E. Sidahmed, S. Aid, M. Shimoji, T. Niikura, I. Mocchetti, G. W. Rebeck, J. S. Prendergast, C. Dealwis, R. Wetzel, F. Bosetti, Y. Matsuoka, H.-S. Hoe and R. S. Turner (2010). Therapeutic versus neuroinflammatory effects of passive immunization is dependent on Aβ/amyloid burden in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. **7:** 57.
Mondragón-Rodríguez, S., G. Basurto-Islas, I. Santa-Maria, R. Mena, L. I. Binder, J. Avila, M. A. Smith, G. Perry and F. García-Sierra (2008). Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. Int J Exp Pathol. **89:** 81-90.
Monsonego, A., V. Zota, A. Karni, J. I. Krieger, A. Bar-Or, G. Bitan, A. E. Budson, R. Sperling, D. J. Selkoe and H. L. Weiner (2003). Increased T cell reactivity to amyloid beta protein in older humans and patients with Alzheimer disease. J Clin Invest. **112:** 415-22.
Morgan, D. (2011). Immunotherapy for Alzheimer's disease. Journal of Internal Medicine. **269:** 54-63.
Morgan, D., D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, P. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K. Connor, J. Hatcher, C. Hope, M. Gordon and G. W. Arendash (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. Nature. **408:** 982-5.
Morris, M., S. Maeda, K. Vossel and L. Mucke (2011). The many faces of tau. Neuron. **70:** 410-26.
Morsch, R., W. Simon and P. D. Coleman (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. J Neuropathol Exp Neurol. **58:** 188-97.

N

Necula, M. and J. Kuret (2004). Pseudophosphorylation and glycation of tau protein enhance but do not trigger fibrillization in vitro. J Biol Chem. **279:** 49694-703.
Neuwelt, E. A., B. Bauer, C. Fahlke, G. Fricker, C. Iadecola, D. Janigro, L. Leybaert, Z. Molnár, M. E. O'Donnell, J. T. Povlishock, N. R. Saunders, F. Sharp, D. Stanimirovic, R. J. Watts and L. R. Drewes (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. Nat Rev Neurosci. **12:** 169-82.
Neve, R. L., P. Harris, K. S. Kosik, D. M. Kurnit and T. A. Donlon (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. Brain Res. **387:** 271-80.
Nicoll, J. A. R., E. Barton, D. Boche, J. W. Neal, I. Ferrer, P. Thompson, C. Vlachouli, D. Wilkinson, A. Bayer, D. Games, P. Seubert, D. Schenk and C. Holmes (2006). Abeta species removal after abeta42 immunization. J Neuropathol Exp Neurol. **65:** 1040-8.

Nicoll, J. A. R., D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham and R. O. Weller (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-b peptide: a case report. Nat Med. **9:** 448-52.

Nikolic, W. V., Y. Bai, D. Obregon, H. Hou, T. Mori, J. Zeng, J. Ehrhart, R. D. Shytle, B. Giunta, D. Morgan, T. Town and J. Tan (2007). Transcutaneous beta-amyloid immunization reduces cerebral beta-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. Proc Natl Acad Sci USA. **104:** 2507-12.

Nishioku, T., J. Matsumoto, S. Dohgu, N. Sumi, K. Miyao, F. Takata, H. Shuto, A. Yamauchi and Y. Kataoka (2010). Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells. J Pharmacol Sci. **112:** 251-4.

Noble, W., V. Olm, K. Takata, E. Casey, O. Mary, J. Meyerson, K. Gaynor, J. LaFrancois, L. Wang, T. Kondo, P. Davies, M. Burns, Veeranna, R. Nixon, D. Dickson, Y. Matsuoka, M. Ahlijanian, L.-F. Lau and K. Duff (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. Neuron. **38:** 555-65.

Noble, W., E. Planel, C. Zehr, V. Olm, J. Meyerson, F. Suleman, K. Gaynor, L. Wang, J. LaFrancois, B. Feinstein, M. Burns, P. Krishnamurthy, Y. Wen, R. Bhat, J. Lewis, D. Dickson and K. Duff (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. **102:** 6990-5.

Noble, W., A. M. Pooler and D. P. Hanger (2011). Advances in tau-based drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery**:** 1-14.

Nonaka, T., S. T. Watanabe, T. Iwatsubo and M. Hasegawa (2010). Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. J Biol Chem. **285:** 34885-98.

Novak, M. (2009). Tau vaccine: Active immunization with misfolded tau protein attenuates tau pathology in the transgenic rat model of tauopathy Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association **5:** 93.

Novak, M. (2010). Tau transgenic rat model and response to tau vaccine. Alzheimer's & Dementia. **6:** 118.

O

Oddo, S., L. Billings, J. P. Kesslak, D. H. Cribbs and F. M. LaFerla (2004). Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. Neuron. **43:** 321-32.

Ohm, T. G., S. Treiber-Held, R. Distl, F. Glöckner, B. Schönheit, M. Tamanai and V. Meske (2003). Cholesterol and tau protein--findings in Alzheimer's and Niemann Pick C's disease. Pharmacopsychiatry. **36 Suppl 2:** S120-6.

O'Leary, J. C., Q. Li, P. Marinec, L. J. Blair, E. E. Congdon, A. G. Johnson, U. K. Jinwal, J. Koren, J. R. Jones, C. Kraft, M. Peters, J. F. Abisambra, K. E. Duff, E. J. Weeber, J. E. Gestwicki and C. A. Dickey (2010). Phenothiazine-mediated rescue of cognition in tau transgenic mice requires neuroprotection and reduced soluble tau burden. Mol Neurodegener. **5:** 45.

Olzscha, H., S. M. Schermann, A. C. Woerner, S. Pinkert, M. H. Hecht, G. G. Tartaglia, M. Vendruscolo, M. Hayer-Hartl, F. U. Hartl and R. M. Vabulas (2011). Amyloid-like aggregates sequester numerous matastable proteins with essential cellular functions. Cell. **144:** 67-78.

Orgogozo, J.-M., S. Gilman, J.-F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, B. Dubois, L. Eisner, S. Flitman, B. F. Michel, M. Boada, A. Frank and C. Hock (2003).

Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. Neurology. **61:** 46-54.

P

Panza, F., V. Frisardi, B. P. Imbimbo, D. Seripa, F. Paris, A. Santamato, G. D'Onofrio, G. Logroscino, A. Pilotto and V. Solfrizzi (2011). Anti-β-Amyloid Immunotherapy for Alzheimer's Disease: Focus on Bapineuzumab. Current Alzheimer research.

Papachroni, K. K., N. Ninkina, A. Papapanagiotou, G. M. Hadjigeorgiou, G. Xiromerisiou, A. Papadimitriou, A. Kalofoutis and V. L. Buchman (2007). Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. J Neurochem. **101:** 749-56.

Paquet, D., R. Bhat, A. Sydow, E.-M. Mandelkow, S. Berg, S. Hellberg, J. Fälting, M. Distel, R. W. Köster, B. Schmid and C. Haass (2009). A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. J Clin Invest. **119:** 1382-95.

Paschal, B. M. and R. B. Vallee (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. Nature. **330:** 181-3.

Patrias, L. M., A. C. Klaver, M. P. Coffey and D. A. Loeffler (2010). Specific antibodies to soluble alpha-synuclein conformations in intravenous immunoglobulin preparations. Clin Exp Immunol. **161:** 527-35.

Patterson, K. R., C. Remmers, Y. Fu, S. Brooker, N. M. Kanaan, L. Vana, S. Ward, J. F. Reyes, K. Philibert, M. J. Glucksman and L. I. Binder (2011). Characterization of prefibrillar tau oligomers in vitro and in Alzheimers disease. J Biol Chem.

Pennanen, L. and J. Götz (2005). Different tau epitopes define Abeta42-mediated tau insolubility. Biochemical and Biophysical Research Communications. **337:** 1097-101.

Peretz, D., R. A. Williamson, K. Kaneko, J. Vergara, E. Leclerc, G. Schmitt-Ulms, I. R. Mehlhorn, G. Legname, M. R. Wormald, P. M. Rudd, R. A. Dwek, D. R. Burton and S. B. Prusiner (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. Nature. **412:** 739-43.

Pérez, M., F. Hernández, F. Lim, J. Díaz-Nido and J. Avila (2003). Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. J Alzheimers Dis. **5:** 301-8.

Perrier, V., J. Solassol, C. Crozet, Y. Frobert, C. Mourton-Gilles, J. Grassi and S. Lehmann (2004). Anti-PrP antibodies block PrPSc replication in prion-infected cell cultures by accelerating PrPC degradation. J Neurochem. **89:** 454-63.

Pfeifer, M., S. Boncristiano, L. Bondolfi, A. Stalder, T. Deller, M. Staufenbiel, P. M. Mathews and M. Jucker (2002). Cerebral hemorrhage after passive anti-Abeta immunotherapy. Science. **298:** 1379.

Phillips, R. G. and J. E. LeDoux (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behav Neurosci. **106:** 274-85.

Pickhardt, M., Z. Gazova, M. Von Bergen, I. Khlistunova, Y. Wang, A. Hascher, E. M. Mandelkow, J. Biernat and E. Mandelkow (2005). Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. Journal of Biological Chemistry. **280:** 3628.

Planel, E., K. E. G. Richter, C. E. Nolan, J. E. Finley, L. Liu, Y. Wen, P. Krishnamurthy, M. Herman, L. Wang, J. B. Schachter, R. B. Nelson, L.-F. Lau and K. E. Duff (2007). Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. J Neurosci. **27:** 3090-7.

Pooler, A. M. and D. P. Hanger (2010). Functional implications of the association of tau with the plasma membrane. Biochem Soc Trans. **38:** 1012-5.

Porzig, R., D. Singer and R. Hoffmann (2007). Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. Biochemical and Biophysical Research Communications. **358:** 644-9.

Pride, M., P. Seubert, M. Grundman, M. Hagen, J. Eldridge and R. S. Black (2008). Progress in the active immunotherapeutic approach to Alzheimer's disease: clinical investigations into AN1792-associated meningoencephalitis. Neurodegener Dis. **5:** 194-6.

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science. **216:** 136-44.

Pul, R., R. Dodel and M. Stangel (2011). Antibody-based therapy in Alzheimer's disease. Expert Opin Biol Ther. **11:** 343-57.

Q

Qian, W., J. Shi, X. Yin, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, C.-X. Gong and F. Liu (2010). PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3beta. J Alzheimers Dis. **19:** 1221-9.

R

Rabchevsky, A. G., J. D. Degos and P. A. Dreyfus (1999). Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis. Brain Res. **832:** 84-96.

Racke, M. M., L. I. Boone, D. L. Hepburn, M. Parsadainian, M. T. Bryan, D. K. Ness, K. S. Piroozi, W. H. Jordan, D. D. Brown, W. P. Hoffman, D. M. Holtzman, K. R. Bales, B. D. Gitter, P. C. May, S. M. Paul and R. B. DeMattos (2005). Exacerbation of cerebral amyloid angiopathy-associated microhemorrhage in amyloid precursor protein transgenic mice by immunotherapy is dependent on antibody recognition of deposited forms of amyloid beta. J Neurosci. **25:** 629-36.

Reed, S. G., S. Bertholet, R. N. Coler and M. Friede (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends Immunol. **30:** 23-32.

Relkin, N., L. Backes and R. Schiff (2011). Changes in plasma cytokine levels correlate with clinical outcomes in Alzheimer's patients treated with intravenous immunoglobulin. Alzheimer's & Dementia. **7:** 693-694.

Relkin, N. R., P. Szabo, B. Adamiak, T. Burgut, C. Monthe, R. W. Lent, S. Younkin, L. Younkin, R. Schiff and M. E. Weksler (2009). 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. Neurobiol Aging. **30:** 1728-36.

Reynolds, A. D., D. K. Stone, J. A. L. Hutter, E. J. Benner, R. L. Mosley and H. E. Gendelman (2010). Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. J Immunol. **184:** 2261-71.

Reynolds, C. H., C. J. Garwood, S. Wray, C. Price, S. Kellie, T. Perera, M. Zvelebil, A. Yang, P. W. Sheppard, I. M. Varndell, D. P. Hanger and B. H. Anderton (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. J Biol Chem. **283:** 18177-86.

Richter, M., R. Hoffmann and D. Singer (2011). Peptide vaccines for treatment of Alzheimer's disease - characterization of T-cell epitope-dependent immune response in wild-type mice. Alzheimer's & Dementia. **7:** 663.

Rinne, J. (2011). Brain [11C]-PIB uptake reflects beta-amyloid burden detected by immunohistochemistry in frontal cortex biopsy specimens. Alzheimer's & Dementia. **7:** 230.

Rissman, R. A., W. W. Poon, M. Blurton-Jones, S. Oddo, R. Torp, M. P. Vitek, F. M. LaFerla, T. T. Rohn and C. W. Cotman (2004). Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. J Clin Invest. **114:** 121-30.

Robertson, L. A., K. L. Moya and K. C. Breen (2004). The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. **6:** 489-95.

Rodriguez-Martin, T., K. Anthony, M. A. Garcia-Blanco, S. G. Mansfield, B. H. Anderton and J.-M. Gallo (2009). Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. Hum Mol Genet. **18:** 3266-73.

Rodriguez-Martin, T., M. A. Garcia-Blanco, S. G. Mansfield, A. C. Grover, M. Hutton, Q. Yu, J. Zhou, B. H. Anderton and J.-M. Gallo (2005). Reprogramming of tau alternative splicing by spliceosome-mediated RNA trans-splicing: implications for tauopathies. Proc Natl Acad Sci USA. **102:** 15659-64.

Rodríguez-Navarro, J. A., L. Rodríguez, M. J. Casarejos, R. M. Solano, A. Gómez, J. Perucho, A. M. Cuervo, J. García de Yébenes and M. A. Mena (2010). Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. Neurobiology of Disease. **39:** 423-38.

Rosenmann, H., N. Grigoriadis, D. Karussis, M. Boimel, O. Touloumi, H. Ovadia and O. Abramsky (2006). Tauopathy-like abnormalities and neurologic deficits in mice immunized with neuronal tau protein. Arch Neurol. **63:** 1459-67.

Ross, C. A. and S. J. Tabrizi (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. Lancet Neurol. **10:** 83-98.

Rosset, M. B., A. Sacquin, S. Lecollinet, T. Chaigneau, M. Adam, F. Crespeau and M. Eloit (2009). Dendritic cell-mediated-immunization with xenogenic PrP and adenoviral vectors breaks tolerance and prolongs mice survival against experimental scrapie. PLoS ONE. **4:** e4917.

Rutgers, K. S., R. J. A. Nabuurs, S. A. A. v. d. Berg, G. J. Schenk, M. Rotman, C. T. Verrips, S. G. v. Duinen, M. L. Maat-Schieman, M. A. v. Buchem, A. G. d. Boer and S. M. v. d. Maarel (2011). Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the in vitro blood–brain barrier. NSC**:** 1-6.

S

Sahara, N., S. Maeda and A. Takashima (2008). Tau oligomerization: a role for tau aggregation intermediates linked to neurodegeneration. Current Alzheimer research. **5:** 591-8.

Saito, Y., N. N. Ruberu, M. Sawabe, T. Arai, N. Tanaka, Y. Kakuta, H. Yamanouchi and S. Murayama (2004). Staging of argyrophilic grains: an age-associated tauopathy. J Neuropathol Exp Neurol. **63:** 911-8.

Salloway, S., R. Sperling, S. Gilman, N. C. Fox, K. Blennow, M. Raskind, M. Sabbagh, L. S. Honig, R. Doody, C. H. van Dyck, R. Mulnard, J. Barakos, K. M. Gregg, E. Liu, I. Lieberburg, D. Schenk, R. Black, M. Grundman and B. C. T. Investigators (2009). A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. Neurology. **73:** 2061-70.

Salminen, A., J. Ojala, K. Kaarniranta, M. Hiltunen and H. Soininen (2011). Hsp90 regulates tau pathology through co-chaperone complexes in Alzheimer's disease. Progress in Neurobiology. **93:** 99-110.

Santacruz, K., J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, A. Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton and K. H. Ashe (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. Science. **309:** 476-81.

Sasaki, A., T. Kawarabayashi, T. Murakami, E. Matsubara, M. Ikeda, H. Hagiwara, D. Westaway, P. S. George-Hyslop, M. Shoji and Y. Nakazato (2008). Microglial activation in brain lesions with tau deposits: comparison of human tauopathies and tau transgenic mice TgTauP301L. Brain Res. **1214:** 159-68.

Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, J. Huang, K. Johnson-Wood, K. Khan, D. Kholodenko, M. Lee, Z. Liao, I. Lieberburg, R. Motter, L. Mutter, F. Soriano, G. Shopp, N. Vasquez, C. Vandevert, S. Walker, M. Wogulis, T. Yednock, D. Games and P. Seubert (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. Nature. **400:** 173-7.

Schindowski, K., A. Bretteville, K. Leroy, S. Bégard, J.-P. Brion, M. Hamdane and L. Buée (2006). Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. Am J Pathol. **169:** 599-616.

Schlachetzki, J. C. M. and M. Hüll (2009). Microglial activation in Alzheimer's disease. Current Alzheimer research. **6:** 554-63.

Sela, M. and M. R. Hilleman (2004). Therapeutic vaccines: realities of today and hopes for tomorrow. Proc Natl Acad Sci USA. **101 Suppl 2:** 14559.

Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol Rev. **81:** 741-66.

Senior, K. (2002). Dosing in phase II trial of Alzheimer's vaccine suspended. Lancet Neurol. **1:** 3.

Sergeant, N., A. Bretteville, M. Hamdane, M.-L. Caillet-Boudin, P. Grognet, S. Bombois, D. Blum, A. Delacourte, F. Pasquier, E. Vanmechelen, S. Schraen-Maschke and L. Buée (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. Expert review of proteomics. **5:** 207-24.

Sergeant, N., J. P. David, M. Goedert, R. Jakes, P. Vermersch, L. Buée, D. Lefranc, A. Wattez and A. Delacourte (1997a). Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. J Neurochem. **69:** 834-44.

Sergeant, N., J. P. David, D. Lefranc, P. Vermersch, A. Wattez and A. Delacourte (1997b). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. FEBS Lett. **412:** 578-82.

Sergeant, N., A. Delacourte and L. Buée (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. Biochimica et biophysica acta. **1739:** 179-97.

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

Seshadri, S., A. L. Fitzpatrick, M. A. Ikram, A. L. DeStefano, V. Gudnason, M. Boada, J. C. Bis, A. V. Smith, M. M. Carassquillo, J. C. Lambert, D. Harold, E. M. C. Schrijvers, R. Ramirez-Lorca, S. Debette, W. T. Longstreth, A. C. J. W. Janssens, V. S. Pankratz, J. F. Dartigues, P. Hollingworth, T. Aspelund, I. Hernandez, A. Beiser, L. H. Kuller, P. J. Koudstaal, D. W. Dickson, C. Tzourio, R. Abraham, C. Antunez, Y. Du, J. I. Rotter, Y. S. Aulchenko, T. B. Harris, R. C. Petersen, C. Berr, M. J. Owen, J. Lopez-

Arrieta, B. N. Varadarajan, J. T. Becker, F. Rivadeneira, M. A. Nalls, N. R. Graff-Radford, D. Campion, S. Auerbach, K. Rice, A. Hofman, P. V. Jonsson, H. Schmidt, M. Lathrop, T. H. Mosley, R. Au, B. M. Psaty, A. G. Uitterlinden, L. A. Farrer, T. Lumley, A. Ruiz, J. Williams, P. Amouyel, S. G. Younkin, P. A. Wolf, L. J. Launer, O. L. Lopez, C. M. van Duijn, M. M. B. Breteler, C. Consortium, G. Consortium and E. Consortium (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. JAMA. **303:** 1832-40.

Seubert, P., R. Barbour, K. Khan, R. Motter, P. Tang, D. Kholodenko, K. Kling, D. Schenk, K. Johnson-Wood, S. Schroeter, D. Gill, J. S. Jacobsen, M. Pangalos, G. Basi and D. Games (2008). Antibody capture of soluble Abeta does not reduce cortical Abeta amyloidosis in the PDAPP mouse. Neurodegener Dis. **5:** 65-71.

Shankle, W. and J. Hara (2009). Longitudinal measure of IVIg treatment effect in patients with Alzheimer's and Lewy body disease. Alzheimer's & Dementia**:** 1-1.

Shemesh, O. A. and M. E. Spira (2011). Rescue of neurons from undergoing hallmark tau-induced Alzheimer's disease cell pathologies by the antimitotic drug paclitaxel. Neurobiology of Disease. **43:** 163-75.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Perkicak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens and P. H. St George-Hyslop (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. Nature. **375:** 754-60.

Shiryaev, N., Y. Jouroukhin, E. Giladi, E. Polyzoidou, N. C. Grigoriadis, H. Rosenmann and I. Gozes (2009). NAP protects memory, increases soluble tau and reduces tau hyperphosphorylation in a tauopathy model. Neurobiology of Disease. **34:** 381-8.

Siemers, E. R., S. Friedrich, R. A. Dean, C. R. Gonzales, M. R. Farlow, S. M. Paul and R. B. DeMattos (2010). Safety and changes in plasma and cerebrospinal fluid amyloid beta after a single administration of an amyloid beta monoclonal antibody in subjects with Alzheimer disease. Clin Neuropharmacol. **33:** 67-73.

Sigurdsson, E. M. (2008). Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. J Alzheimers Dis. **15:** 157-68.

Sigurdsson, E. M., H. Scholtzova, P. D. Mehta, B. Frangione and T. Wisniewski (2001). Immunization with a nontoxic/nonfibrillar amyloid-beta homologous peptide reduces Alzheimer's disease-associated pathology in transgenic mice. The American Journal of Pathology. **159:** 439-47.

Sigurdsson, E. M., M.-S. Sy, R. Li, H. Scholtzova, R. J. Kascsak, R. Kascsak, R. Carp, H. C. Meeker, B. Frangione and T. Wisniewski (2003). Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice. Neurosci Lett. **336:** 185-7.

Singer, D., M. Richter, A. Mewes, M. Fritsch, C. Höfling, U. Krügel, T. Züchner, M. Blessing, R. Hoffmann and S. Roßner (2011). Peptide vaccines for treatment of Alzheimer's disease: immunization trails in transgenic P301S and Tg2576 mice. Alzheimer's & Dementia. **7:** 666.

Sjöberg, M. K., E. Shestakova, Z. Mansuroglu, R. B. Maccioni and E. Bonnefoy (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. J Cell Sci. **119:** 2025-34.

Solomon, B. and D. Frenkel (2010). Immunotherapy for Alzheimer's disease. Neuropharmacology. **59:** 303-9.

Solomon, B., R. Koppel, D. Frankel and E. Hanan-Aharon (1997). Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. Proc Natl Acad Sci USA. **94:** 4109-12.

Solomon, B., R. Koppel, E. Hanan and T. Katzav (1996). Monoclonal antibodies inhibit in vitro fibrillar aggregation of the Alzheimer beta-amyloid peptide. Proc Natl Acad Sci USA. **93:** 452-5.

Song, C.-H., H. Furuoka, C.-L. Kim, M. Ogino, A. Suzuki, R. Hasebe and M. Horiuchi (2008). Effect of intraventricular infusion of anti-prion protein monoclonal antibodies on disease progression in prion-infected mice. J Gen Virol. **89:** 1533-44.

Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, G. S. Bloom and M. C. Mumby (1996). Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. Neuron. **17:** 1201-7.

Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, R. Brandt, C. Kamibayashi, J. Kuret, C. L. White, M. C. Mumby and G. S. Bloom (1999). Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. J Biol Chem. **274:** 25490-8.

Souan, L., Y. Tal, Y. Felling, I. R. Cohen, A. Taraboulos and F. Mor (2001). Modulation of proteinase-K resistant prion protein by prion peptide immunization. Eur J Immunol. **31:** 2338-46.

Southwell, A. L., J. Ko and P. H. Patterson (2009). Intrabody gene therapy ameliorates motor, cognitive, and neuropathological symptoms in multiple mouse models of Huntington's disease. J Neurosci. **29:** 13589-602.

Spillantini, M. G. and M. Goedert (1998). Tau protein pathology in neurodegenerative diseases. Trends Neuroscience. **21:** 428-33.

Spillantini, M. G., M. Goedert, R. A. Crowther, J. R. Murrell, M. R. Farlow and B. Ghetti (1997a). Familial multiple system tauopathy with presenile dementia: a disease with abundant neuronal and glial tau filaments. Proc Natl Acad Sci USA. **94:** 4113-8.

Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert (1997b). Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. **388:** 839-40.

Spires-Jones, T. L., K. J. Kopeikina, R. M. Koffie, A. De Calignon and B. T. Hyman (2011). Are Tangles as Toxic as They Look? J Mol Neurosci.

Steinhilb, M. L., D. Dias-Santagata, T. A. Fulga, D. L. Felch and M. B. Feany (2007). Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. Mol Biol Cell. **18:** 5060-8.

Stills, H. F. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. ILAR J. **46:** 280-93.

Stozicka, Z., N. Zilka, P. Novak, B. Kovacech, O. Bugos and M. Novak (2010). Genetic background modifies neurodegeneration and neuroinflammation driven by misfolded human tau protein in rat model of tauopathy: implication for immunomodulatory approach to Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. **7:** 64.

Sudol, K. L., M. A. Mastrangelo, W. C. Narrow, M. E. Frazer, Y. R. Levites, T. E. Golde, H. J. Federoff and W. J. Bowers (2009). Generating differentially targeted amyloid-beta specific intrabodies as a passive vaccination strategy for Alzheimer's disease. Mol Ther. **17:** 2031-40.

Sultan, A., F. Nesslany, M. Violet, S. Bégard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buée and M.-C. Galas (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. J Biol Chem. **286:** 4566-75.

Suzukake, M., S. Watanabe, N. Suzuki, S.-i. Hisanaga and M. Hasegawa (2011). Evaluation of the tau aggregation inhibitors and immunization with phosphorylated tau peptides in tauopathy model mice. Alzheimer's & Dementia. **7:** 482.

Suzuki, N., T. T. Cheung, X. D. Cai, A. Odaka, L. Otvos, C. Eckman, T. E. Golde and S. G. Younkin (1994). An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by

familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. Science. **264:** 1336-40.
Sydow, A., A. Van der Jeugd, F. Zheng, T. Ahmed, D. Balschun, O. Petrova, D. Drexler, L. Zhou, G. Rune, E. Mandelkow, R. D'Hooge, C. Alzheimer and E.-M. Mandelkow (2011). Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant. J Neurosci. **31:** 2511-25.

T

Tabira, T. (2010). Immunization therapy for Alzheimer disease: A comprehensive review of active immunization strategies. Tohoku J. Exp. Med. **220:** 95-106.
Taniguchi, S., N. Suzuki, M. Masuda, S. Hisanaga, T. Iwatsubo, M. Goedert and M. Hasegawa (2005). Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. Journal of Biological Chemistry. **280:** 7614.
Terwel, D., R. Lasrado, J. Snauwaert, E. Vandeweert, C. Van Haesendonck, P. Borghgraef and F. Van Leuven (2005). Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. J Biol Chem. **280:** 3963-73.
Thal, D. R., U. Rüb, M. Orantes and H. Braak (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. Neurology. **58:** 1791-800.
Theunis, C., N. Crespo-Biel, M. Pihlgren, P. Borghgraef, H. Devijver, V. Gafner, D. Hickman, N. Chuard, M. P. L. Deber, P. Reis, A. L. Buccarello, O. Adolfsson, S. Roeber, H. Kretzschmar, A. Pfeifer, A. Muhs and F. V. Leuven (2011). Novel phospho-tau-specific liposome-based vaccines to treat tau pathology. Alzheimer's & Dementia. **7:** 687.
Tomljenovic, L. and A. Shaw (2011). Aluminum Vaccine Adjuvants: Are they Safe? Curr Med Chem. **18:** 2630-2637.
Trinczek, B., J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. Mol Biol Cell. **6:** 1887-902.

V

Vellas, B., R. Black, L. J. Thal, N. C. Fox, M. Daniels, G. McLennan, C. Tompkins, C. Leibman, M. Pomfret, M. Grundman and A. Q.-.-S. Team (2009). Long-term follow-up of patients immunized with AN1792: reduced functional decline in antibody responders. Current Alzheimer research. **6:** 144-51.
Vermout, S., M. Denis, B. Losson and B. Mignon (2003). Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. Ann Méd Vét. **147:** 393-401.
Verny, M., C. Duyckaerts, Y. Agid and J. J. Hauw (1996). The significance of cortical pathology in progressive supranuclear palsy. Clinico-pathological data in 10 cases. Brain. **119 (Pt 4):** 1123-36.
Vetrugno, V., A. Cardinale, I. Filesi, S. Mattei, M.-S. Sy, M. Pocchiari and S. Biocca (2005). KDEL-tagged anti-prion intrabodies impair PrP lysosomal degradation and inhibit scrapie infectivity. Biochemical and Biophysical Research Communications. **338:** 1791-7.
Von Bergen, M., P. Friedhoff, J. Biernat, J. Heberle, E. M. Mandelkow and E. Mandelkow (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. Proc Natl Acad Sci USA. **97:** 5129-34.

Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc. **1:** 848-58.
Voronkov, M., S. Braithwaite and J. B. Stock (2011). Phosphoprotein phosphatase 2A: a novel druggable target for Alzheimer's disease. Future Med Chem. **3:** 821-833.
Vulih-Shultzman, I., A. Pinhasov, S. Mandel, N. Grigoriadis, O. Touloumi, Z. Pittel and I. Gozes (2007). Activity-dependent neuroprotective protein snippet NAP reduces tau hyperphosphorylation and enhances learning in a novel transgenic mouse model. J Pharmacol Exp Ther. **323:** 438-49.

W

Waldmann, T. A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. Nat Med. **9:** 269-77.
Walker, F. O. (2007). Huntington's disease. Lancet. **369:** 218-28.
Wang, C.-E., H. Zhou, J. R. McGuire, V. Cerullo, B. Lee, S.-H. Li and X.-J. Li (2008). Suppression of neuropil aggregates and neurological symptoms by an intracellular antibody implicates the cytoplasmic toxicity of mutant huntingtin. J Cell Biol. **181:** 803-16.
Wang, Y., M. Martinez-Vicente, U. Krüger, S. Kaushik, E. Wong, E. Mandelkow, A. Cuervo and E. Mandelkow (2009). Tau Fragmentation, Aggregation and Clearance: the Dual Role of Lysosomal Processing. Hum Mol Genet. **18:** 4153-70.
Wei, Y., M.-H. Qu, X.-S. Wang, L. Chen, D.-L. Wang, Y. Liu, Q. Hua and R.-Q. He (2008). Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. PLoS ONE. **3:** e2600.
Weiner, H. L. and D. Frenkel (2006). Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. Nat Rev Immunol. **6:** 404-16.
Weiner, H. L., C. A. Lemere, R. Maron, E. T. Spooner, T. J. Grenfell, C. Mori, S. Issazadeh, W. W. Hancock and D. J. Selkoe (2000). Nasal administration of amyloid-beta peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. Ann Neurol. **48:** 567-79.
Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. Proc Natl Acad Sci USA. **72:** 1858-62.
Weksler, M. E., G. Gouras, N. R. Relkin and P. Szabo (2005). The immune system, amyloid-beta peptide, and Alzheimer's disease. Immunol Rev. **205:** 244-56.
White, A. R., P. Enever, M. Tayebi, R. Mushens, J. Linehan, S. Brandner, D. Anstee, J. Collinge and S. Hawke (2003). Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. Nature. **422:** 80-3.
Wilcock, D. M., S. K. Munireddy, A. Rosenthal, K. E. Ugen, M. N. Gordon and D. Morgan (2004). Microglial activation facilitates Abeta plaque removal following intracranial anti-Abeta antibody administration. Neurobiology of Disease. **15:** 11-20.
Wilcock, D. M., A. Rojiani, A. Rosenthal, G. Levkowitz, S. Subbarao, J. Alamed, D. Wilson, N. Wilson, M. J. Freeman, M. N. Gordon and D. Morgan (2004). Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. J Neurosci. **24:** 6144-51.
Winblad, B. (2009). Results of the first-in-human study with the active Abeta immunotherapy CAD106 in Alzheimer patients. Therapeutics and Therapeutic Strategies : Immunotherapy. **Oral O2-05-05:** 1-2.
Wischik, C., P. Edwards, R. Lai, M. Roth and C. Harrington (1996). Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. Proceedings of the National Academy of Sciences. **93:** 11213.

Wischik, C. and R. Staff (2009). Challenges in the conduct of disease-modifying trials in AD: practical experience from a phase 2 trial of Tau-aggregation inhibitor therapy. J Nutr Health Aging. **13:** 367-9.

Wischik, C. M., M. Novak, H. C. Thøgersen, P. C. Edwards, M. J. Runswick, R. Jakes, J. E. Walker, C. Milstein, M. Roth and A. Klug (1988). Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA. **85:** 4506-10.

Wisniewski, T. and A. Boutajangout (2010). Vaccination as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. Mt Sinai J Med. **77:** 17-31.

Wood, K. M., F. Mccush, J. J. Conboy, R. Durham, B. Tate, M. M. Bednar, J. W. Landen, K. F. Geoghegan and K. R. Bales (2011). IP/MS analysis of human CSF Aβ following a single dose of the C-terminal anti-Abeta; antibody ponezumab (PF-04360365) to Alzheimer patients. Alzheimer's & Dementia. **6:** 311

Wright, J. L. and R. E. Merchant (1994). Blood-brain barrier changes following intracerebral injection of human recombinant tumor necrosis factor-alpha in the rat. J Neurooncol. **20:** 17-25.

Wuertzer, C. A., M. A. Sullivan, X. Qiu and H. J. Federoff (2008). CNS delivery of vectored prion-specific single-chain antibodies delays disease onset. Mol Ther. **16:** 481-6.

Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? Nat Med. **12:** 1005-15.

Y

Yamada, K., C. Yabuki, P. Seubert, D. Schenk, Y. Hori, S. Ohtsuki, T. Terasaki, T. Hashimoto and T. Iwatsubo (2009). Abeta immunotherapy: intracerebral sequestration of Abeta by an anti-Abeta monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Abeta. J Neurosci. **29:** 11393-8.

Yanagisawa, M., E. Planel, K. Ishiguro and S. C. Fujita (1999). Starvation induces tau hyperphosphorylation in mouse brain: implications for Alzheimer's disease. FEBS Lett. **461:** 329-33.

Yirmiya, R. and I. Goshen (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. Brain Behav Immun. **25:** 181-213.

Yoshiyama, Y., M. Higuchi, B. Zhang, S.-M. Huang, N. Iwata, T. C. Saido, J. Maeda, T. Suhara, J. Q. Trojanowski and V. M.-Y. Lee (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. Neuron. **53:** 337-51.

Yu, W., M. Ko, K. Yanagisawa and M. Michikawa (2005). Neurodegeneration in heterozygous Niemann-Pick type C1 (NPC1) mouse: implication of heterozygous NPC1 mutations being a risk for tauopathy. J Biol Chem. **280:** 27296-302.

Yuzwa, S. A., M. S. Macauley, J. E. Heinonen, X. Shan, R. J. Dennis, Y. He, G. E. Whitworth, K. A. Stubbs, E. J. McEachern, G. J. Davies and D. J. Vocadlo (2008). A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. Nat Chem Biol. **4:** 483-90.

Z

Zhang, B., A. Maiti, S. Shively, F. Lakhani, G. McDonald-Jones, J. Bruce, E. B. Lee, S. X. Xie, S. Joyce, C. Li, P. M. Toleikis, V. M.-Y. Lee and J. Q. Trojanowski (2005). Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. Proc Natl Acad Sci USA. **102:** 227-31.

Zhang, Y. and W. M. Pardridge (2001). Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier. Journal of Neuroimmunology. **114:** 168-72.

Zhao, Q., S. Abe, I. Miyoshi, M. M. Bednar, J. W. Kupiec and Y. Fujimoto (2010). Pharmacokinetics of ponezumab (PF-04360365) following a single-dose intravenous infusion in Japanese patients with mild-to-moderate Alzheimer•s disease: Preliminary results. Alzheimer's & Dementia. **6:** 305.

Zhou, C., S. Emadi, M. R. Sierks and A. Messer (2004). A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. Mol Ther. **10:** 1023-31.

Zhou, J., Q. Yu and T. Zou (2008). Alternative splicing of exon 10 in the tau gene as a target for treatment in tauopathies. BMC Neurosci. **9:** S10.

Zhou, Q.-H., A. Fu, R. J. Boado, E. K.-W. Hui, J. Z. Lu and W. M. Pardridge (2011). Receptor-mediated abeta amyloid antibody targeting to Alzheimer's disease mouse brain. Mol Pharm. **8:** 280-5.

Zhou, X. Z., O. Kops, A. Werner, P. J. Lu, M. Shen, G. Stoller, G. Küllertz, M. Stark, G. Fischer and K. P. Lu (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. Mol Cell. **6:** 873-83.

Zilka, N., Z. Stozicka, A. Kovac, E. Pilipcinec, O. Bugos and M. Novak (2009). Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the transgenic rat model of tauopathy. Journal of Neuroimmunology. **209:** 16-25.

Zlokovic, B., D. Skundric, M. Segal, M. N. Lipovac, J. B. Mackic and H. Davson (1990). A saturable mechanism for transport of immunoglobulin G across the blood-brain barrier of the guinea pig. Experimental Neurology. **107:** 263-270.

Zonnur, S., V. Meske, J. Götz and T.G Ohm (2010). Niemann Picks disease C1 (NPC1) protein protects from tau pathology in P301L tau mice. Neurodegeneration **P1212**

Zuber, C., S. Knackmuss, C. Rey, U. Reusch, P. Röttgen, T. Fröhlich, G. J. Arnold, C. Pace, G. Mitteregger, H. A. Kretzschmar, M. Little and S. Weiss (2008). Single chain Fv antibodies directed against the 37 kDa/67 kDa laminin receptor as therapeutic tools in prion diseases. Mol Immunol. **45:** 144-51.