



HAL
open science

Propagation axonale des pathologies Tau et $A\beta$ dans la maladie d'Alzheimer : à la recherche de propagons dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire

Manon Thierry

► **To cite this version:**

Manon Thierry. Propagation axonale des pathologies Tau et $A\beta$ dans la maladie d'Alzheimer : à la recherche de propagons dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS243 . tel-03373728

HAL Id: tel-03373728

<https://theses.hal.science/tel-03373728>

Submitted on 11 Oct 2021

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.

Thèse de Doctorat

Spécialité : Neurosciences

**Propagation axonale des pathologies Tau et A β dans la maladie d'Alzheimer :
à la recherche de propagons dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire**

Par Manon Thierry

Sous la direction du Pr. Charles Duyckaerts et du Dr. Marie-Claude Potier

Soutenue publiquement le 8 juillet 2020

Composition du jury

Pr. Pierre Aucouturier	Président du jury
Pr. Jean-Pierre Brion	Rapporteur
Dr. Ronald Melki	Rapporteur
Dr. Marie-Christine Chartier-Harlin	Examinatrice
Pr. Maria Grazia Spillantini	Examinatrice
Pr. Charles Duyckaerts	Directeur de thèse
Dr. Marie-Claude Potier	Co-directrice de thèse

Table des matières

Table des matières

Remerciements	9
Résumé	15
Abréviations	19
Introduction	23
1. La maladie d'Alzheimer	25
1.1. Aspects cliniques	25
1.1.1. La maladie d'Alzheimer typique.....	25
1.1.2. Variantes cliniques	25
1.1.3. Critères diagnostiques cliniques	26
1.2. Aspects neuropathologiques.....	27
1.2.1. Examen macroscopique.....	27
1.2.2. Examen microscopique	28
1.2.2.1. Pathologie A β	28
1.2.2.2. Pathologie Tau	33
1.2.2.3. Perte neuronale	35
1.2.2.4. Perte synaptique.....	35
1.2.2.5. Neuroinflammation.....	35
1.2.3. Critères diagnostiques neuropathologiques	36
1.3. Aspects moléculaires	37
1.3.1. Le peptide A β	37
1.3.1.1. Métabolisme	37
1.3.1.2. Conditions physiologiques	38
1.3.1.3. Conditions pathologiques.....	39
1.3.1.4. Génétique	40
1.3.2. La protéine Tau	41
1.3.2.1. Expression	41
1.3.2.2. Conditions physiologiques	41
1.3.2.3. Conditions pathologiques.....	43
1.3.2.4. Génétique	44
2. Prion, type-prion et propagon.....	47
2.1. Le concept de prion	47
2.1.1. Un agent transmissible non conventionnel	47

2.1.2. Encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles.....	48
2.1.3. Mode d'action du prion	48
2.1.3.1. PrPc versus PrPsc	48
2.1.3.2. Conversion, agrégation et propagation	50
2.1.3.3. Multirésistance.....	52
2.1.3.4. Notion de souche	52
2.2. La maladie d'Alzheimer vue sous l'angle du prion.....	53
2.2.1. Les origines d'un nouveau paradigme.....	53
2.2.2. Analogies entre le prion et l'A β	53
2.2.2.1. La pathologie A β est-elle transmissible ?	53
2.2.2.2. Quelles espèces d'A β peuvent induire la pathologie ?	54
2.2.2.3. Existe-t-il un effet souche pour l'A β ?.....	55
2.2.3. Analogies entre le prion et la Tau	56
2.2.3.1. La pathologie Tau est-elle transmissible ?	56
2.2.3.2. Quelles espèces de Tau peuvent induire la pathologie ?.....	57
2.2.3.3. Existe-t-il un effet souche pour Tau ?.....	58
2.3. Les limites de l'hypothèse prion : nuances et propagons	59
2.3.1. Les limites de l'hypothèse prion	59
2.3.2. Définitions d'un propagon.....	59
3. Dissémination des propagons A β et Tau.....	63
3.1. Progression de la pathologie A β	63
3.1.1. Topographie des lésions	63
3.1.2. Voies de transport putatives des propagons A β	63
3.1.2.1. Connexions neuroanatomiques	63
3.1.2.2. Diffusion passive	65
3.1.2.3. Implication des cellules gliales	66
3.2. Progression de la pathologie Tau	66
3.2.1. Topographie des lésions	66
3.2.2. Voies de transport putatives des propagons Tau.....	67
3.2.2.1. Connexions neuroanatomiques	67
3.2.2.2. Implication des cellules gliales	69
3.3. Relations entre les progressions des pathologies Tau et A β	70
3.3.1. Les pathologies A β et Tau ne sont pas indépendantes	70
3.3.2. La pathologie A β influence-t-elle la progression de la pathologie Tau ?	71

3.3.3. La pathologie Tau influence-t-elle la progression de la pathologie A β ?	72
Problématiques et objectifs	75
1. Problématiques.....	77
2. Le système subiculo-fornico-mamillaire.....	77
2.1. Anatomie	77
2.2. Fonctions	78
2.3. Atteinte au cours de la maladie d'Alzheimer	79
3. Objectifs	80
Matériels et méthodes	83
Résultats	97
1. Distribution des pathologies A β et Tau dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire	99
1.1. Accumulation d'A β dans le système subiculo-fornico-mamillaire	99
1.2. Accumulation de Tau-p dans le système subiculo-fornico-mamillaire	99
1.3. Topographie des accumulations d'A β et de Tau-p dans le corps mamillaire	101
2. Caractérisation de la pathologie Tau axonale du pilier du fornix.....	105
2.1. Propriétés pathogéniques des espèces de Tau-p observées dans le pilier du fornix.....	105
2.2. Caractérisation des propagons de Tau observés dans le pilier du fornix.....	106
2.2.1. Propriétés immunoréactives et argyrophiles de la pathologie Tau axonale	106
2.2.2. Analyse en microscopie électronique de la pathologie Tau axonale	107
3. Relations hiérarchiques et topographiques des pathologies A β et Tau.....	110
3.1. Relations hiérarchiques	110
3.2. Relations topographiques	111
4. Relation entre la pathologie Tau axonale et l'accumulation d'A β	114
4.1. Conséquences de la pathologie Tau sur les axones du pilier du fornix	114
4.2. Pathologie axonale et accumulation d'APP dans le corps mamillaire	115
Discussion	117
1. Distribution des pathologies A β et Tau dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire	119
1.1. L'A β s'accumule dans le subiculum puis le corps mamillaire, mais épargne le pilier du fornix.....	119
1.2. La pathologie Tau progresse de façon antérograde dans le système subiculo-fornico-mamillaire	121
2. Caractérisation de la pathologie Tau axonale dans le pilier du fornix	121
2.1. Les axones du pilier du fornix transportent des propagons Tau	121
2.2. Les propagons Tau transportés par le pilier du fornix ne sont pas fibrillaires	122

3. Relations hiérarchiques et topographiques entre les pathologies A β et Tau	123
4. Hypothèses physiopathologiques	124
5. Conclusions et perspectives	128
Références	131
Annexes	157
Publications	161

Remerciements

Remerciements

Je remercie le Pr. Pierre Aucouturier d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Merci au Pr. Jean-Pierre Brion et au Dr. Ronald Melki d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs.

Merci également au Dr. Marie-Christine Chartier-Harlin et au Pr. Maria Grazia Spillantini pour leur participation à mon jury de thèse en tant qu'examinatrices.

Je ne remercierai jamais assez le Pr. Charles Duyckaerts de m'avoir initiée à la neuropathologie et pour la confiance qu'il m'a accordée en me permettant de travailler sur ce beau projet. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, toujours avec gentillesse et patience. Merci également de m'avoir donné l'opportunité de partager mes résultats lors de congrès internationaux. Je vous suis très reconnaissante pour tout ce que vous m'avez apporté, scientifiquement et humainement. J'ai été ravie d'avoir pu côtoyer votre immense savoir, votre sagesse et votre humour durant ces quelques années. Je n'aurais pas espéré meilleur mentor pour mes premiers pas dans la recherche.

Je remercie chaleureusement le Dr. Marie-Claude Potier d'avoir co-encadré mon doctorat. Merci pour ta disponibilité et pour nos discussions, toujours enrichissantes et rassurantes. Ta bienveillance et tes conseils ont contribué à ce que cette thèse se déroule en toute sérénité. Je t'en suis profondément reconnaissante.

Je remercie l'école doctorale « Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique – ED394 » (Sorbonne Université) d'avoir financé ma thèse en m'attribuant une allocation ministérielle. Merci à ses directeurs, le Pr. Xavier Houard et le Dr. Catherine Monnot, ainsi qu'à sa gestionnaire Séverine Lowinski pour sa disponibilité et son efficacité. Je remercie également la Fondation France Alzheimer dont le soutien financier a permis la prolongation de ce travail de recherche.

Je remercie le Dr. Marc Dhenain pour son expertise ainsi que pour nos échanges enrichissants. Merci également au Dr. Guillaume Dorothée d'avoir été mon tuteur universitaire.

Merci à l'ensemble des médecins du service de neuropathologie Raymond Escourolle qui ont permis la collecte et l'examen neuropathologique des échantillons humains étudiés dans ce projet : Pr. Charles Duyckaerts, Pr. Danielle Seilhean, Dr. Susana Boluda, Dr. Véronique Sazdovitch et Dr. Isabelle Plu. Merci aux membres de l'équipe technique pour leur précieuse aide : Andry, Agueda, Edouard, Camille, Isabelle, Yolaine et Matthieu, ainsi que les anciens Léna, Omar et Francesca. Je remercie particulièrement Valérie pour sa patience et pour tout ce qu'elle m'a appris.

Merci à la Banque de Cerveaux Neuro-CEB (numéro BRIF 0033-00011), hébergée par la Plateforme des Ressources Biologiques de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (APHP), pour la mise à disposition des échantillons *post-mortem* humains. Je remercie notamment Sabrina Leclère-Turbant et Marie-Claire Artaud pour leur aide technique et pour la gestion des échantillons. Merci à l'ensemble des associations de patients qui soutiennent financièrement la Banque : l'ARSEP, l'ARSLA, « Connaître les Syndromes Cérébelleux », France-DFT, France Parkinson et la Fondation Vaincre Alzheimer. Je tiens également à exprimer toute ma gratitude aux patients ainsi qu'à leur famille.

Je remercie l'ensemble de l'équipe « Alzheimer », notamment les Drs. Benoît Delatour et Serge Marty pour votre bienveillance, vos conseils avisés et l'expertise que vous avez apportée durant ma thèse. Merci également à tous les membres de l'équipe que j'ai eu plaisir à rencontrer : Florence, Yah-Se, Lev, Marta, Amal, Laura, Léa, ainsi que les anciens Luce, Lydie, Linda, Arthur, Teng-Fei, Ihsen, Jonathan et Hadrien. Merci à Kunie pour tes précieux conseils techniques et pour nos discussions toujours fructueuses. Je remercie également l'ensemble de l'équipe « Prions » dont j'ai apprécié la compagnie durant ces quelques années. Merci au Dr. Stéphane Haïk pour vos conseils toujours bienvenus. Je tiens également à remercier Sofian, Etienne et Besma pour leur gentillesse ainsi que pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à l'équipe de la plateforme d'histologie *Histomics* pour son accueil toujours sympathique. Merci notamment à Annick pour ses nombreux conseils techniques et pour sa gentillesse constante. Je remercie également les membres de la plateforme d'imagerie *ICM.Quant* pour leur aide et leurs conseils techniques. Je tiens à remercier en particulier Dominique pour son expertise en microscopie électronique et sa conversation, toujours agréable et passionnante. Un grand merci à Julien pour sa patience et sa bonne humeur durant nos

longues séances d'acquisition et d'analyse d'images de tissus clarifiés. Merci également à la plateforme de culture cellulaire *CELIS*.

Je remercie chaleureusement ceux qui ont partagé mon quotidien durant cette thèse et qui, au fil des années, sont devenus bien plus que des collègues. Merci pour ces magnifiques souvenirs que vous me laissez. Vous allez me manquer, bien que je ne doute pas un instant du fait que nos chemins se recroiseront.

- Merci à Susana pour tous ces bons moments partagés, au laboratoire ou en dehors. Merci pour nos innombrables discussions ainsi que pour tout ce que tu m'as apporté, professionnellement et personnellement. J'ai adoré travailler à tes côtés et je suis ravie d'avoir eu la chance de te rencontrer.
- Merci à mes colocataires d'Escourolle qui m'ont fait l'honneur de m'intégrer dans le clan des « Prions ». Merci à Audrey pour ton empathie et ta positivité exemplaire. Merci à Katarina pour ton énergie et ta jovialité contagieuse. Merci à Alexianne, mon porte-bonheur ambulante dont la folie et les surprises cachées dans le bureau me manqueront. Merci à Patricia que j'ai l'impression de connaître depuis toujours. Merci à Nicolas pour sa sympathie et sa sérénité apaisante. Merci également à Serfi que j'aurais souhaité connaître davantage.
- Merci à l'ensemble des membres du bureau « 5.041 ». Merci aux trois anciennes qui me manquent un peu plus chaque jour. Merci à Christelle pour ton humour inégalable. Merci à Gaëlle pour ta gaieté et ton écoute. Merci à Alexandra pour ton soutien infaillible et ta bonne humeur inébranlable qui égayait mes journées. Merci à Alexandre pour ces bons souvenirs de congrès et pour ta gentillesse illimitée. Un grand merci aux deux Alex de m'avoir fait partager leur expérience de la thèse ; vous avoir à mes côtés m'a beaucoup aidée à évoluer en toute tranquillité. Merci à Geoffrey, dont les visites trop peu nombreuses passaient toujours bien trop vite. Merci également aux nouveaux venus que j'aurais aimé côtoyer plus longtemps. Merci à Ammara pour ton immense générosité et merci à Maximilien pour ces bons moments passés ensemble.

Enfin, je remercie infiniment ma famille pour votre soutien inconditionnel. Savoir que je pourrai toujours compter sur vous est une chance inestimable. Ne changez rien, vous êtes parfaits.

Résumé

Résumé

Dans la maladie d'Alzheimer (MA), les agrégations de Tau et d'A β se forment séquentiellement dans des régions discontinues, mais connectées. Le rôle des axones dans la propagation de ces lésions a été étudié dans le pilier du fornix, un faisceau bien individualisé d'axones issus du subiculum et se terminant dans le corps mamillaire. Quarante-sept cas *post-mortem* de stades de Braak (Tau) et de phases de Thal (A β) variés ont été analysés par immunohistochimie.

La pathologie Tau progressait du subiculum au corps mamillaire. Des accumulations de Tau, fines et fragmentées, ont été observées dans le pilier du fornix ; elles étaient associées à la présence de dégénérescences neurofibrillaires dans le subiculum. Les accumulations axonales de Tau étaient constituées de protéines Tau anormalement phosphorylées (AT8 et TG3 positives), mais non fibrillaires (Gallyas négatives). Elles étaient intra-axonales et dépourvues de filaments hélicoïdaux appariés en microscopie électronique. Des homogénats de piliers du fornix affectés par la pathologie Tau induisaient l'agrégation de Tau P301S dans des biosenseurs cellulaires. La pathologie A β se développait d'abord dans le subiculum puis dans le corps mamillaire, mais épargnait le pilier du fornix. Aucun ordre hiérarchique n'a pu être établi entre les accumulations de Tau et d'A β dans ce système. Ces dernières étaient cependant étroitement corrélées, notamment les pathologies Tau du pilier du fornix et A β du corps mamillaire. L'accumulation de Tau dans le pilier du fornix était associée à la présence de sphéroïdes axonaux, signes d'une dégénérescence des axones, et de terminaisons axonales dystrophiques APP positives localisées dans le corps mamillaire. Des contacts entre les axones Tau positifs et les dépôts d'A β ont été observés dans le corps mamillaire à proximité de l'arrivée du pilier du fornix, par les techniques de CLARITY et de microcryodissection.

Nous avons montré, chez l'Homme, que les axones du pilier du fornix transmettent la pathologie Tau du subiculum au corps mamillaire en véhiculant des espèces de Tau anormalement phosphorylées mais non fibrillaires, aux propriétés de type prion – justifiant le terme de « propagons ». La pathologie A β n'a pas été détectée dans le pilier du fornix. Les pathologies Tau et A β pouvaient selon les cas être initiales dans ce système : cet ordre inconstant est incompatible avec une relation de cause à effet. Cependant, les deux pathologies étaient corrélées et intimement associées, indiquant une synergie de ces deux processus indépendamment initiés. Une telle interaction a probablement lieu au niveau de la plaque sénile, où les lésions Tau et A β convergent.

Mots-clés : maladie d'Alzheimer, Tau, A β , système subiculo-fornico-mamillaire, propagons, axones.

Abréviations

Liste des abréviations

AAC : Angiopathie Amyloïde Cérébrale

APP : Amyloid Precursor Protein

ARTAG : Age Related Tau AstroGliopathy

A β : peptide β -Amyloïde

CERAD : Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire

ESST : Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles

GWAS : Genome-Wide Association Study

IWG : International Working Group

MA : Maladie d'Alzheimer

MAPT : Microtubule Associated Protein Tau

MBP : Myelin Basic Protein

NIA-AA : National Institute on Aging – Alzheimer's Association

NINCDS-ADRDA : National Institute of Neurological Disorders and Stroke–Alzheimer Disease and Related Disorders Association

PART : Primary Age-Related Tauopathy

PHF : Paired Helical Filament

PMCA : Protein Misfolding Cyclic Amplification

PS1, PS2 : Préséniline 1, Préséniline 2

RT-QuIC : Real-Time Quaking-Induced Conversion

Souris tg *gène* (Mutation) : souris transgénique « *gène* » portant la mutation « *Mutation* »

Tau : protéine Tau

Tau-p : protéine Tau anormalement phosphorylée

Introduction

1. La maladie d'Alzheimer

1.1. Aspects cliniques

1.1.1. La maladie d'Alzheimer typique

D'après les critères du « *National Institute of Neurological Disorders et Stroke–Alzheimer Disease et Related Disorders Association* » (ou NINCDS-ADRDA, critères de McKhann et al., 1984, révisés dans McKhann et al., 2011) et de l'« *International Working Group* » (ou IWG, critères de Dubois et al., 2007, révisés dans Dubois et al., 2014), la maladie d'Alzheimer (MA) se manifeste cliniquement par un ensemble d'altérations cognitives comprenant :

- **Un syndrome amnésique de type hippocampique**, caractéristique. Ce syndrome est défini par une altération significative de la mémoire épisodique, caractérisée par un déficit de rappel libre et indicé, malgré un encodage initial de l'information contrôlé (e.g. test des cinq mots, Dubois et al., 2002). Ces altérations restent dominantes et s'aggravent au cours de la maladie.
- **Au moins l'un de ces troubles cognitifs** additionnels, d'après les critères du NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 2011) :
 - **Apraxie** : trouble du geste volontaire non expliqué par un déficit moteur ou somesthésique ;
 - **Aphasie** : déficit de la compréhension du langage ou de son élaboration ;
 - **Agnosie** : trouble de la reconnaissance visuelle ou auditive, non expliqué par un déficit sensoriel. Le déficit de la reconnaissance des visages (prosopagnosie) et donc de l'identité des individus est également fréquente.

D'abord insidieux, ces symptômes progressent et s'intensifient sur plusieurs années jusqu'à engendrer une perte d'autonomie qui caractérise la phase démentielle tardive de la MA. A ce stade avancé s'opèrent des changements comportementaux, en rupture avec la personnalité antérieure du patient (agitation, perte de motivation, repli sur soi, troubles du comportement, ...).

1.1.2. Variantes cliniques

Les manifestations cliniques de la MA sont hétérogènes (Dubois et al., 2014; McKhann et al., 2011). Il existe des **formes atypiques** de la MA, plus rares (6-14% des cas) et moins bien définies, dans lesquelles la préservation relative des fonctions mnésiques est associée à un

phénotype atypique ; c'est le cas des variants postérieur bipariétal (trouble visuospatial) ou occipitotemporal (agnosies), logopénique (appauvrissement du langage) et frontal (trouble des fonctions exécutives et changement comportemental). Il est, de plus, rare que la MA se manifeste seule, surtout chez le sujet très âgé. Des **formes mixtes** sont fréquentes (50% des cas). Leur tableau clinique complexe est caractérisé par un déclin cognitif accentué par la ou les pathologies concomitantes (*e.g.* maladies cérébrovasculaires, maladie à corps de Lewy, sclérose hippocampique).

1.1.3. Critères diagnostiques cliniques

Les manifestations cliniques de la MA ne sont que l'expression phénotypique de lésions encéphaliques – et plus particulièrement corticales – qui précèdent les premiers symptômes de plusieurs décennies, durant une **phase asymptomatique**. Ces lésions sont déjà abondantes quand apparaissent les symptômes cognitifs, initialement modérés et non intégrés dans un syndrome démentiel durant la **phase prodromale** de la maladie. Cette phase inclut des patients présentant des altérations cognitives modérées (ou MCI, pour « *mild cognitive impairment* »), telles que des déficits mnésiques ou portant sur une autre fonction cognitive, dans un contexte de vie socio-professionnelle non affectée par la maladie. Si elle se produit, la MA évolue finalement en un **syndrome démentiel** (Dubois et al., 2007). L'identification de biomarqueurs protéiques (le peptide A β et la protéine Tau hyperphosphorylée, présentés plus loin), associée au raffinement des outils diagnostiques, a permis au diagnostic clinique de la MA de gagner en spécificité et sensibilité. Les derniers critères du NINCDS-ADRDA (McKhann et al., 2011) et de l'IWG (Dubois et al., 2014) sont ainsi fondés sur la combinaison d'arguments cliniques et biologiques (analyse de biomarqueurs dans le LCR ou en TEP). Il est désormais possible de diagnostiquer la MA dès son stade prodromal avec un niveau de probabilité élevé. Malgré l'amélioration des techniques d'analyse de ces biomarqueurs du vivant des patients, l'analyse *post-mortem* de l'encéphale demeure essentielle pour accéder aux altérations cellulaires et histologiques de la maladie de façon directe. Les lésions neuropathologiques constituent, en l'absence de mécanisme, les éléments essentiels du diagnostic (*cf.* section 1.2.3).

1.2. Aspects neuropathologiques

1.2.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique de l'encéphale ne révèle que des modifications légères et souvent aspécifiques, principalement dans les formes tardives de la maladie (**Figure 1**). Cette analyse est toutefois nécessaire afin d'éliminer d'autres causes de démence, telles des anomalies vasculaires (qui peuvent être associées à la MA), une tumeur frontale ou une hydrocéphalie. Les modifications macroscopiques principales incluent une dilatation du troisième ventricule et des ventricules latéraux, associée à une atrophie corticale (Duyckaerts et Dickson, 2011).

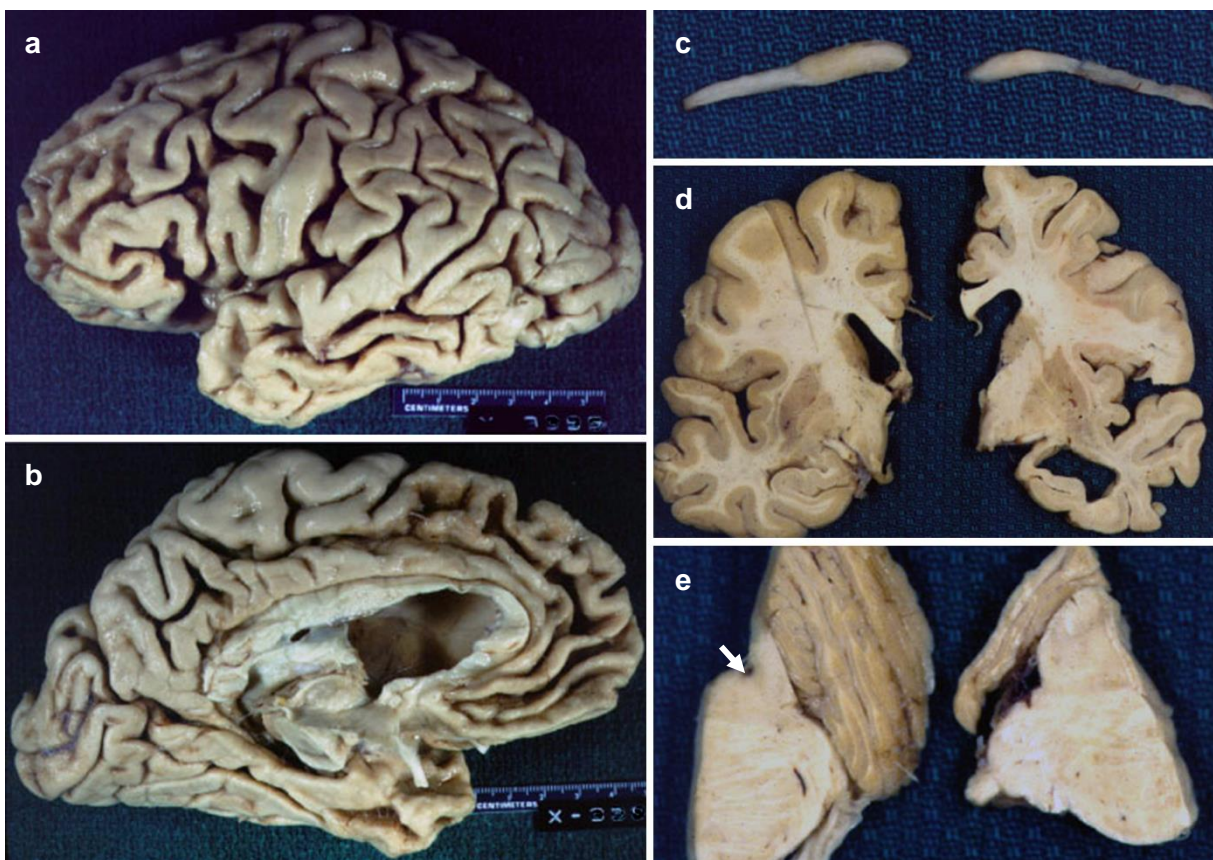


Figure 1 : Modifications macroscopiques majeures associées à la maladie d'Alzheimer. a-b) Vues latérale et médiane d'un cerveau de patient atteint de maladie d'Alzheimer. a) La vue latérale montre une atrophie corticale diffuse particulièrement marquée dans les lobes frontal et temporal. b) La partie médiane du lobe temporal et le pôle frontal sont atrophiés. c-e) Comparaison d'un cerveau sans altération macroscopique (côté gauche) et d'un cerveau dont l'atrophie a été attribuée à une maladie d'Alzheimer (côté droit). c) Le bulbe olfactif est plus petit que la normale dans la maladie d'Alzheimer. d) Les coupes coronales révèlent un amincissement du ruban cortical qui concerne surtout la partie médiane du lobe temporal, avec une atrophie marquée de l'hippocampe antérieur. e) Dans le pont, le *locus caeruleus* (flèche) est dépigmenté chez le sujet Alzheimer.

Figure 1 tirée de Duyckaerts et Dickson, 2011.

Cette atrophie concerne particulièrement le cortex du lobe temporal et est secondaire à la diminution de l'épaisseur du ruban cortical et de sa longueur (Duyckaerts et al., 1985).

1.2.2. Examen microscopique

Sur le plan microscopique, la MA était initialement caractérisée par la présence de deux types de lésions, révélées par la technique d'imprégnation argentique de Bielchowsky : la plaque sénile et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). La plaque sénile est une lésion composite, formée d'un cœur amyloïde extracellulaire rouge Congo positif entouré d'une couronne de lésions neurofibrillaires neuritiques (**Figures 2a et 2b**). Grâce aux progrès de la biologie moléculaire et à l'apport de l'immunohistochimie, les composantes de ces lésions caractéristiques ont été identifiées : la MA est désormais définie par l'accumulation extracellulaire du peptide β -amyloïde ($A\beta$) et par l'accumulation intraneuronale de la protéine Tau anormalement et excessivement phosphorylée (Tau-p). Le peptide $A\beta$ et la protéine Tau prennent dans les lésions un aspect fibrillaire, caractéristique de l'amyloïde pour le premier (Cohen et Calkins, 1964), en filaments hélicoïdaux appariés (PHF, pour « *paired helical filaments* ») pour la seconde (Kidd, 1963 ; **Figures 2c et 2d**).

1.2.2.1. Pathologie $A\beta$

Identification du peptide $A\beta$ dans la « substance amyloïde »

La substance amyloïde identifiée dans les organes périphériques a d'abord été qualifiée de cireuse ou de lardacée, avant que sa coloration par le lugol ne suggère une parenté avec l'amidon, d'où le terme d'amyloïde (littéralement « qui ressemble à l'amidon »). Les corps amylocés étaient mis en évidence par la même réaction et considérés, à tort, comme amyloïdes (Virchow, 1854). Friedrich et Kekulé montrèrent que la substance amyloïde qui s'accumulait dans le foie, la rate ou le cœur était riche en azote, ce qui laissait présager sa nature protéique (Friedrich et Kekulé, 1859). La coloration par le rouge Congo et le dichroïsme vert qu'elle provoquait étaient plus spécifiques de la substance amyloïde (Bennhold, 1922). Le cœur des plaques séniles est rouge Congo positif (Divry, 1927). La microscopie électronique mit en évidence la structure fibrillaire de ce que l'on croyait toujours être « la » substance amyloïde. La diversité des amyloïdes et leur structure commune – un enrichissement en feuillet β – furent découvertes plus tard. La « substance amyloïde » laissait la place aux protéines ou aux peptides prenant une conformation amyloïde, suggérant à Glenner de les rassembler sous le terme de β -

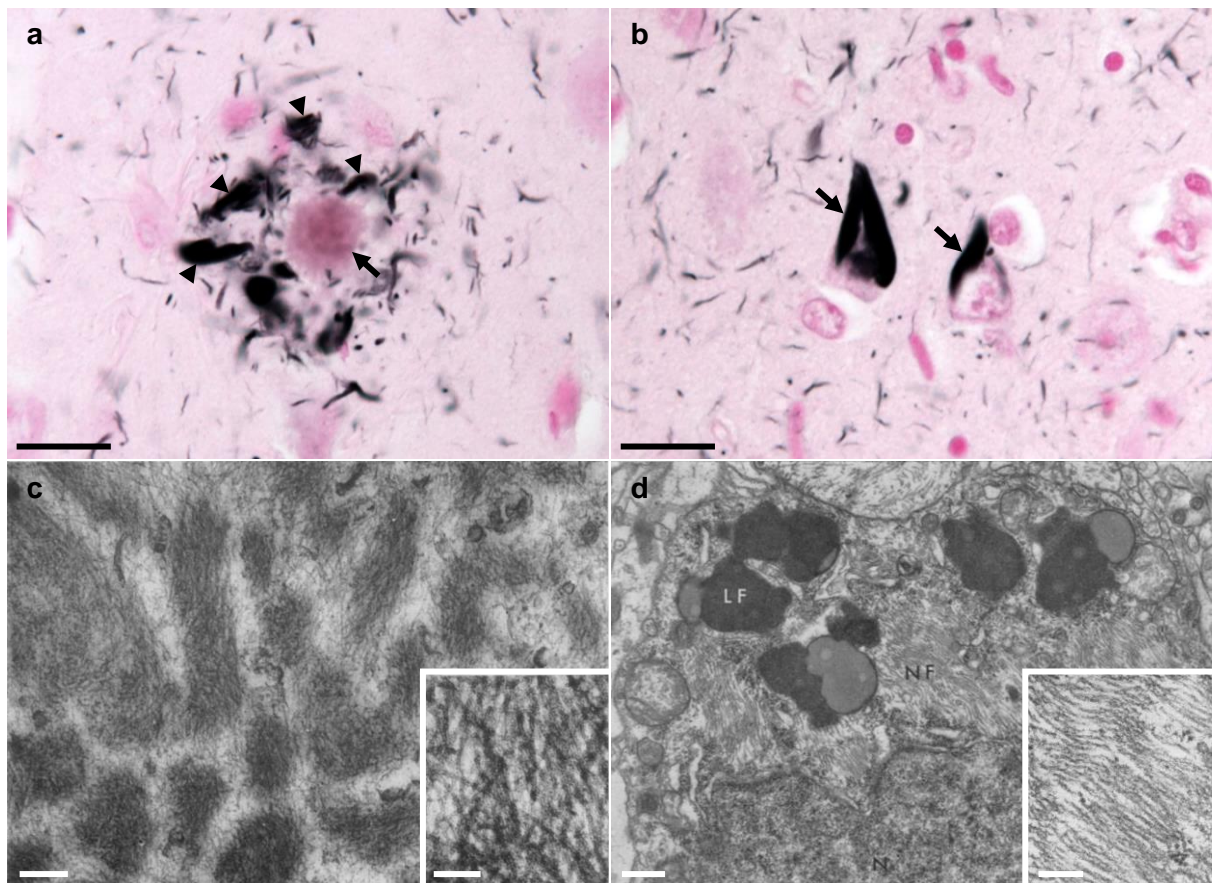


Figure 2 : Principales lésions microscopiques associées à la maladie d'Alzheimer. a-b) Imprégnation argentique de Gallyas. Coupe coronale de l'hippocampe d'un cas de maladie d'Alzheimer. Barres d'échelle : 20 μm . a) Plaque sénile constituée d'un cœur amyloïde dense localisé dans le milieu extracellulaire (flèche), entouré d'une couronne de prolongements neuritiques – principalement axonaux – argyrophiles (têtes de flèches). b) Dégénérescences neurofibrillaires correspondant à l'accumulation anormale de filaments argyrophiles dans le cytoplasme des neurones (flèches). c-d) Microscopie électronique. c) Le cœur amyloïde de la plaque sénile est composé d'une accumulation de fibrilles entremêlées, groupées en faisceaux orientés. Barre d'échelle : 200 nm. L'encart montre ces fibres à plus fort grossissement. Barre d'échelle : 80 nm. d) Cytoplasme d'un neurone occupé par une dégénérescence neurofibrillaire étendue, qui repousse les organelles à la périphérie du corps cellulaire. Barre d'échelle : 560 nm. L'encart montre à plus fort grossissement l'aspect des fibres constituant la dégénérescence neurofibrillaire, structurées en filaments hélicoïdaux appariés (ou PHF, pour « *paired helical filaments* » ; Kidd, 1963). Barre d'échelle : 215 nm. LF : Granule de lipofuscine. NF : Neurofibrilles (terme autrefois employé pour désigner le contenu des dégénérescences neurofibrillaires ; pour R. Terry, ce qui est appelé aujourd'hui PHF était constitué de « tubules torsadés » ou « *twisted tubules* » (Iqbal et al., 1975.)).

Figures 2c et 2d tirées de Terry et al., 1964.

fibrillouses (Glenner, 1980). La définition stricte de l'amyloïde fait aujourd'hui appel aux propriétés suivantes :

- Coloration par le rouge Congo, responsable d'un dichroïsme vert, ou par la thioflavine ;

- Aspect fibrillaire en microscopie électronique ;
- Enrichissement en feuillettes β .

L'isolement et la purification de la substance amyloïde contenue dans la plaque sénile a abouti à l'identification d'un peptide d'abord connu sous le nom de peptide A4 (parce qu'il pesait 4 kDa ; Glenner et Wong, 1984), aujourd'hui appelé **peptide A β** . Le développement d'anticorps anti-A β a révélé par immunohistochimie différents types de dépôts extracellulaires d'A β , tous n'étant pas amyloïdes et entourés d'une couronne neuritique. Le terme de « dépôts d'A β » sera donc préféré au terme de « plaque », la plaque sénile ne constituant qu'un sous-ensemble des dépôts d'A β . L'accumulation d'A β dans l'encéphale, détectée par immunohistochimie, est toujours pathologique. Les dépôts sont parenchymateux ou vasculaires.

Dépôts d'A β parenchymateux

Description neuropathologique. L'accumulation extracellulaire d'A β dans le parenchyme est à l'origine de différents types de dépôts (Delaère et al., 1991 ; **Figures 3a à 3c**) :

- **Les dépôts diffus** (50 – 150 μ m de diamètre)

Ils sont volumineux ; leur contour est tantôt sphérique ou ovoïde, parfois sinueux ou serpiginieux. Faiblement immunoréactifs en raison de leur faible teneur en A β , ils peuvent être traversés par des neurites anormaux Tau-p positifs, mais ne sont pas, par définition, entourés d'une couronne neuritique. Ils ne sont pas amyloïdes et ne sont pas (ou rarement) associés à la présence de macrophages. Le dépôt diffus correspond au premier stade du dépôt d'A β dans le cortex cérébral, bien que des structures présentent des dépôts diffus jusqu'aux stades avancés de la maladie. Dans des structures comme le putamen, ou le cervelet les dépôts sont toujours diffus (Duyckaerts et al., 2009). Dans d'autres, le peptide A β se dépose sous la forme d'un large dépôt couvrant toute la région : ces sont les dépôts en lac de la couche parvocellulaire du présubiculum (Wisniewski et al., 1998) ou les dépôts cotonneux (« fleecy ») du cortex entorhinal (Thal et al., 1999).

- **Les dépôts stellaires** (5 – 10 μ m de diamètre)

Les dépôts stellaires sont constitués de granules, isolées ou regroupées, associés à des prolongements fibrillaires. Intensément marqués et d'aspect hétérogène ils pourraient

correspondre à un stade intermédiaire entre le dépôt d'A β diffus et sa concentration en dépôt dit focal (Delaère et al., 1991). Ils pourraient aussi correspondre à un marquage astrocytaire.

- **Les dépôts focaux** (30 – 50 μ m de diamètre)

Denses et sphériques, les dépôts focaux présentent un contour sphérique bien défini. Leur immunoréactivité intense indique une concentration élevée en peptides A β . Ce dépôt dense peut-être entouré d'un halo d'A β plus diffus. Quelques dépôts focaux sont amyloïdes, et ce de façon corrélée à la présence de cellules microgliales actives (Arends et al., 2000). La microglie, en phagocytant l'A β , pourrait catalyser sa conversion en amyloïde (Frackowiak et al., 1992; Thierry et al., 2017). Selon une autre hypothèse, ce serait le caractère amyloïde du dépôt qui attirerait ou fixerait la cellule microgliale. Certains dépôts focaux sont associés à une couronne de neurites anormaux. La majorité de ces neurites sont

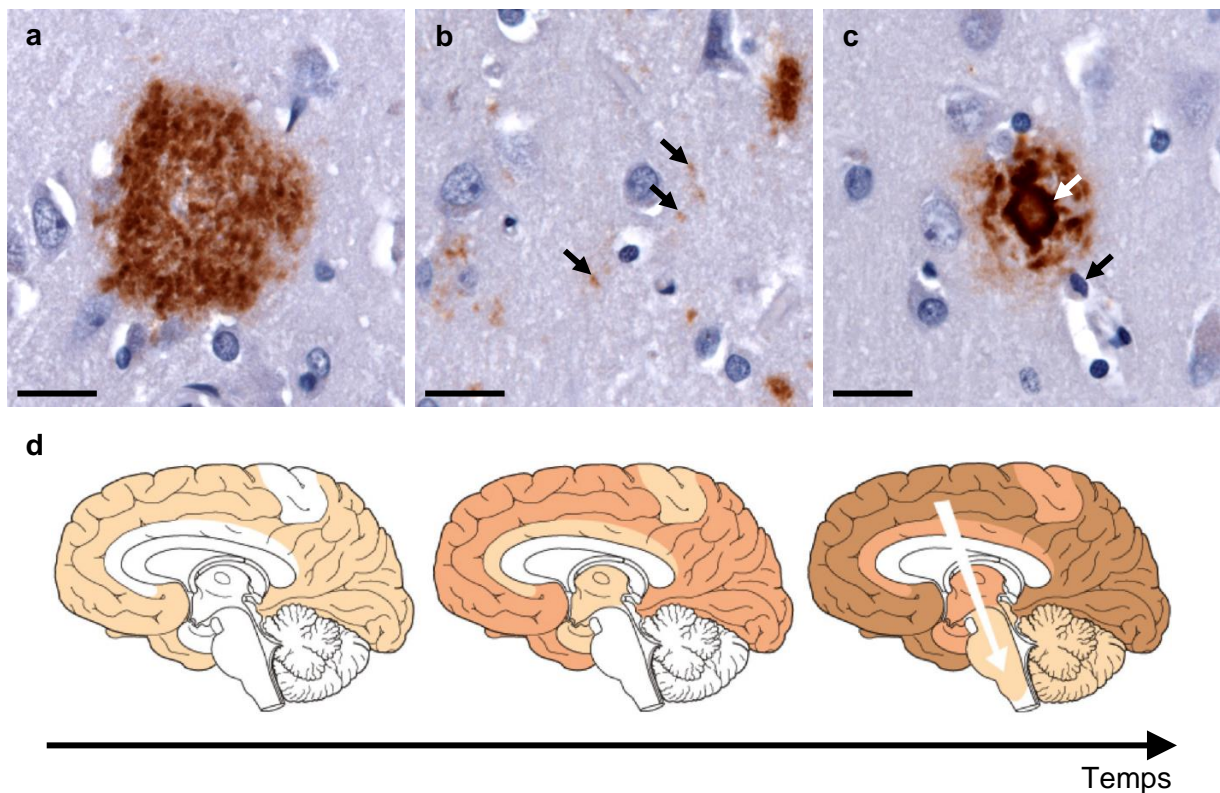


Figure 3 : Pathologie A β . a-c) Immunohistochimies anti-A β 6F3D révélant différents types de dépôts d'A β . Coupe coronale de l'hippocampe d'un cas de maladie d'Alzheimer. Barres d'échelle : 20 μ m. a) Dépôt d'A β diffus. b) Dépôts d'A β stellaires (flèches). c) Dépôt d'A β focal constitué d'un cœur dense d'aspect amyloïde (flèche blanche), entouré d'un halo plus diffus. Un ou plusieurs macrophages peuvent être observés à proximité des dépôts focaux (flèche noire). d) Représentation schématique de la progression de la pathologie A β au cours de la maladie d'Alzheimer, allant du néocortex aux régions sous-corticales.

Figure 3d tirée de Jucker and Walker, 2013 ; d'après Thal et al., 2002b.

tortueux, fins et Tau-p positifs. D'autres présentent un aspect plus globulaire et peuvent être enrichis en APP (précurseur métabolique de l'A β , cf. section 1.3.1.1.). Le dépôt focal amyloïde, entouré d'une couronne neuritique, constitue la « plaque sénile mûre (mature) » ou plaque sénile, au sens strict (Duyckaerts et al., 2009).

Topographie de la pathologie A β . Les dépôts d'A β parenchymateux affectent successivement, de façon séquentielle et stéréotypée, différentes régions neuroanatomiques (**Figure 3d**). Les 5 phases de Thal, dont la topographie est détaillée plus loin (cf. section 3.1.1), décrivent cette progression séquentielle (Thal et al., 2002b). Des dépôts diffus abondants peuvent être observés chez des individus âgés, intellectuellement normaux (Delaère et al., 1990; Knopman et al., 2003). De nombreux dépôts d'A β sont fréquemment détectés dans le cortex cérébral de cas centenaires non déments (Delaère et al., 1993). En outre, la présence d'A β dans le cervelet n'est pas associée à un syndrome cérébelleux.

Dépôts d'A β vasculaires

L'accumulation d'A β pathologique peut également survenir dans la paroi des artères et des veines des leptoméninges et des cortex corticaux et cérébelleux, engendrant une angiopathie amyloïde cérébrale (AAC). Cette atteinte vasculaire peut s'accompagner de petits infarctus, souvent superficiels, et d'hémorragies répétées (Thal et al., 2015). On distingue deux types d'AAC, d'après Thal et al., 2002a :

- **L'AAC de type 1** avec atteinte des capillaires. Elle est corrélée à des stades de Braak élevés et avec une haute probabilité de MA selon les critères du National Institute of Aging-Reagan Institute (NIA-RI ; Attems et Jellinger, 2004).
- **L'AAC de type 2** sans atteinte des capillaires. Elle est plus fréquente et sa corrélation avec les stades de Braak élevés ou la probabilité de MA est faible (Attems et Jellinger, 2004).

L'AAC progresse dans l'encéphale en suivant un ordre stéréotypé (Thal et al., 2002a). Cette progression diffère de celle de la pathologie A β parenchymateuse.

1.2.2.2. Pathologie Tau

Identification de la protéine Tau dans les lésions neurofibrillaires

Après que l'hypothèse de la présence de neurofilaments et de tubulines dans les DNF ait été écartée (Grundke-Iqbal et al., 1985), la pathologie neurofibrillaire s'est avérée être immunomarquée par des anticorps dirigés contre la **protéine Tau** (Brion et al., 1985). Ces résultats histologiques ont été rapidement confirmés par la biochimie (Delacourte et Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986a). L'immunoréactivité des PHF à l'anticorps anti-Tau était très augmentée après action d'une phosphatase, alors que l'immunoréactivité des protéines associées aux microtubules ne l'était pas, une observation qui a suggéré que la protéine Tau des PHF était phosphorylée « de façon atypique » pour reprendre le terme utilisé par Grundke-Iqbal et al. (Grundke-Iqbal et al., 1986b).

Description neuropathologique

L'accumulation intra-cellulaire de Tau-p n'est observée que dans les neurones, les cellules gliales n'étant pas concernées par la pathologie Tau dans la MA. Cette accumulation est à l'origine de trois types de lésions, selon sa localisation subcellulaire (Duyckaerts et al., 2009 ; **Figures 4a à 4c**).

- **Les dégénérescences neurofibrillaires**

L'accumulation de la protéine Tau-p dans le soma des neurones présente d'abord un aspect granulaire, correspondant à des **pré-DNF** (Bancher et al., 1989). En s'accumulant, Tau-p s'agrège : la pré-DNF évolue en **DNF**, présentant une immunoréactivité plus dense et fibrillaire, ainsi que des propriétés d'argyrophilie. A la mort du neurone, la DNF persiste dans le milieu extracellulaire et constitue ainsi la **DNF fantôme**, suggérant un rôle de la pathologie Tau dans la perte neuronale (Cras et al., 1995; Probst et al., 1982).

- **Les fibres tortueuses**

Les fibres tortueuses (Duyckaerts et al., 1989) correspondent à de courts prolongements neuritiques sinueux, Tau-p positifs et argyrophiles, dispersés dans le neuropile (Braak et al., 1986). Ces fibres neuritiques enrichies en Tau-p fibrillaires sont principalement dendritiques (Braak et Braak, 1988).

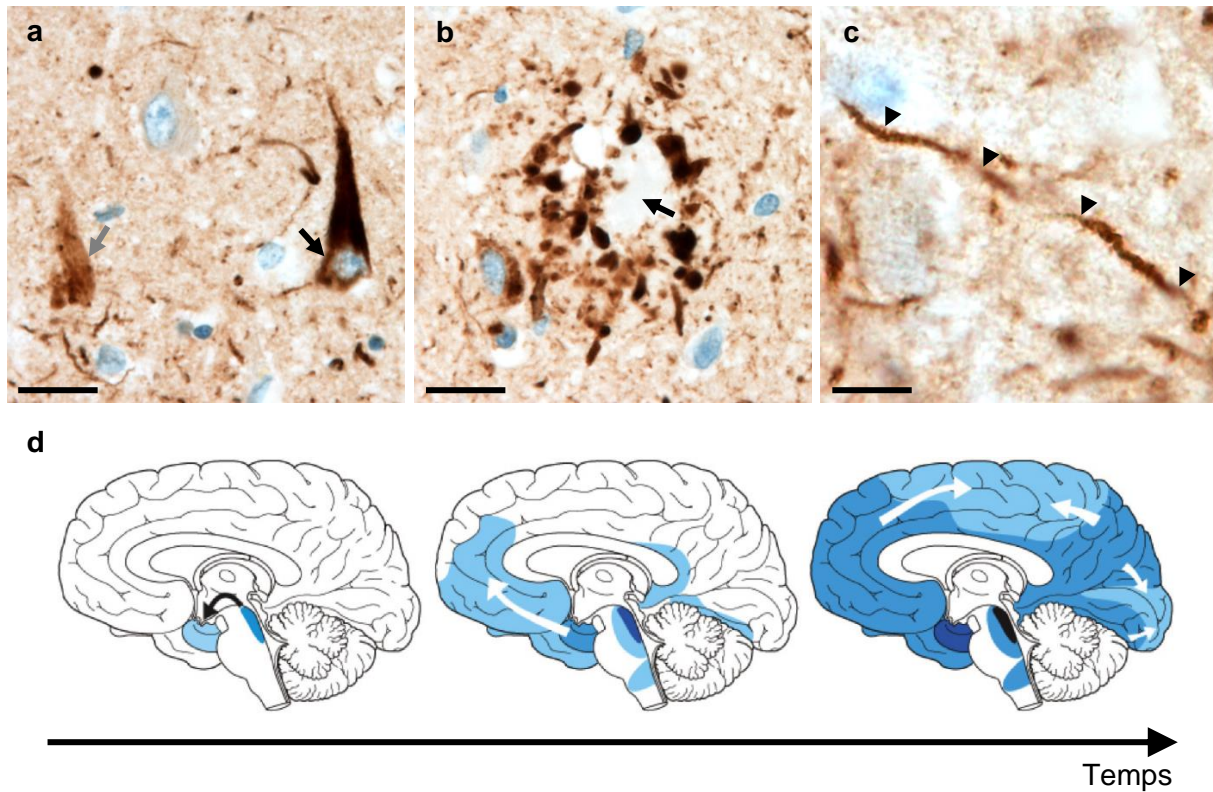


Figure 4 : Pathologie Tau. a-c) Immunohistochimies anti-Tau-p AT8 révélant les différentes composantes de la pathologie Tau. Coupe coronale de l'hippocampe d'un cas de maladie d'Alzheimer. a) Dégénérescence neurofibrillaire (flèche noire) et dégénérescence neurofibrillaire fantôme, persistant dans le milieu extracellulaire à la mort du neurone (flèche grise). Barre d'échelle : 20 µm. b) Couronne neuritique composée principalement d'axones, entourant une substance extracellulaire immunonégative qui correspond au cœur amyloïde dense de la plaque sénile (flèche). Barre d'échelle : 20 µm. c) Observation à plus fort grossissement d'une fibre tortueuse. Son épaisseur et la présence d'épines dendritiques (responsables d'un aspect en double contour), témoignent de sa nature dendritique. Les fibres tortueuses sont nombreuses dans le neuropile. La plupart d'entre elles sont dendritiques. Barre d'échelle : 8 µm. d) Représentation schématique de la progression de la pathologie Tau au cours de la maladie d'Alzheimer. Les premiers neurones Tau-p positifs sont constatés dans le *locus coeruleus* (Braak et al., 2011). A l'étage sus-tentorial, c'est l'aire transentorhinale qui est d'abord affectée avant le néocortex. La signification de la lésion initiale du *locus coeruleus* a été discutée, l'activité de « seeding » du locus coeruleus étant variable et inférieure à celle du cortex transentorhinal (Kaufman et al., 2018).

Figure 4d tirée de Jucker et Walker, 2013 ; d'après Braak et Braak, 1991.

- **Les couronnes neuritiques**

La couronne neuritique de la plaque sénile est constituée de prolongements tortueux. Ils sont dits « dégénérés » quand ils sont Tau-p positifs, et dystrophiques quand ils sont gonflés, APP et ubiquitine positifs. La signature immunohistochimique de ces neurites (Schmidt et

al., 1991), couplée à l'observation de vésicules présynaptiques (Terry et al., 1964), témoignent de leur nature axonale.

Topographie de la pathologie Tau

La pathologie Tau progresse au cours du temps dans des régions cérébrales distinctes, suivant un ordre stéréotypé (**Figure 4d**). La progression de la pathologie Tau est définie par les six stades de Braak (Braak et Braak, 1991), détaillés plus loin (*cf.* section 3.2.1.). Contrairement à la pathologie A β , la densité et la topographie de la pathologie Tau sont en relation statistique étroite avec la dégradation des fonctions intellectuelles (Braak et al., 1993; Duyckaerts et al., 1997).

1.2.2.3. Perte neuronale

La perte neuronale est probablement tardive au cours de la MA, comparativement aux dépôts d'A β et aux agrégations de Tau (West et al., 2004). Elle est associée à la DNF comme en témoignent les DNF fantômes extracellulaires, mais il est à noter que le nombre de neurones perdus dépasse la quantité de DNF (Gómez-Isla et al., 1997). Elle affecte des neurones spécifiques : dans l'hippocampe, la perte des neurones du secteur CA1 distingue la MA du vieillissement (West et al., 1994). Dans le néocortex cérébral, elle touche préférentiellement les couches III et V (Grignon et al., 1998). La perte neuronale est difficile à évaluer du fait de l'atrophie cérébrale qui la masque. On peut d'ailleurs noter qu'elle ne fait pas partie des critères diagnostiques de la maladie (*cf.* section 1.2.3.).

1.2.2.4. Perte synaptique

La perte synaptique observée dans la MA est parfois considérée comme le meilleur corrélat de la détérioration cognitive (Terry et al., 1991). Cette perte synaptique a été principalement évaluée par des dosages ou l'immunohistochimie de la synaptophysine (Masliah et al., 2001) et par des études en microscopie électronique (Scheff et Price, 2006). Elle est précédée par des modifications morphologiques qui ont été étudiées sur des modèles animaux (Androuin et al., 2018). Le mécanisme de ces altérations reste inconnu.

1.2.2.5. Neuroinflammation

Une grande importance a été accordée aux signes inflammatoires qui s'associent aux lésions d'Alzheimer : il s'agit principalement d'une activation microgliale. Les lymphocytes et,

de façon générale, les éléments de la réaction immunitaires acquises sont absents (Webers et al., 2020). Des fractions du complément ont été identifiées dans la plaque sénile et un polymorphisme du récepteur 1 du complément (CR1) a été observé dans les études d'association pangénomiques (GWAS, pour « *genome-wide association study* » ; Crehan et al., 2012). Malgré l'importance de cette réaction, nous ne nous y attarderons pas : nous n'avons pas eu l'occasion de l'étudier de façon spécifique au cours de notre travail.

1.2.3. Critères diagnostiques neuropathologiques

Le diagnostic de la MA repose sur l'examen neuropathologique de ses lésions canoniques : les pathologies A β et Tau. L'observation de ces lésions en l'absence de symptôme clinique a généré plusieurs interprétations, à l'origine de l'évolution des concepts diagnostiques. Le diagnostic neuropathologique de la MA a longtemps nécessité une densité de lésions neuropathologiques (plaques séniles) supérieure à un seuil donné. Les lésions observées en dessous de ce seuil étaient considérées comme relevant du « vieillissement » physiologique ou pathologique. Différents critères diagnostiques seuil-dépendants ont été proposés, tels que les critères âge-dépendants et empiriques de Khachaturian (Khachaturian, 1985) ou les critères semi-quantitatifs du « *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease* » (CERAD), plus reproductibles (Mirra et al., 1991). Ces critères reposaient sur l'examen des plaques séniles, en raison 1) de l'existence de cas de MA considérées comme dépourvues de DNF (en réalité systématiquement présentes dans le système limbique ; Terry et al., 1987) et 2) de la non-spécificité des DNF, rencontrées dans d'autres pathologies (Wisniewski et al., 1979). Selon l'opinion alternative, la présence combinée des pathologies Tau et A β est nécessaire pour porter le diagnostic de MA. Dans ce scénario, la progression de ces lésions neuropathologiques n'aboutit à l'apparition de troubles cognitifs qu'après une longue phase asymptomatique, sans véritable seuil lésionnel toujours arbitraire. Les critères du « *National Institute on Aging – Alzheimer's Association* » (NIA-AA) de 1997 ont abandonné la notion de seuil et l'ont remplacée par celle de « probabilité diagnostique » qui vise à estimer la probabilité que le syndrome démentiel d'un patient puisse être attribué aux lésions neuropathologiques associées à la MA (Hyman et Trojanowski, 1997). Ces critères reposaient sur la densité des plaques séniles (évaluée par la méthode semi-quantitative du CERAD) et l'extension de la pathologie neurofibrillaire (décrite par les stades de Braak). Les nouveaux critères parus en 2012 admettent désormais que les lésions associées à la MA ne sont pas nécessairement responsables de troubles cognitifs. L'étendue de ces lésions est décrite de façon plus exhaustive, en incorporant les phases de Thal pour rendre compte de la pathologie A β . L'application de ces critères permet

l'obtention d'un score ABC (A pour « Amyloïde », B pour « Braak » et C pour CERAD), associé à la probabilité qu'un sujet présente une MA (Hyman et al., 2012; Montine et al., 2012). A noter que les lésions Tau correspondant à des stades de Braak \leq IV ne sont pas considérées par ces critères comme des lésions associées à la MA en l'absence de pathologie A β . Ces cas ont été par la suite isolés sous la dénomination de PART (pour « *primary age-related tauopathy* » ; Cray et al., 2014), un concept discuté (Duyckaerts et al., 2015).

1.3. Aspects moléculaires

1.3.1. Le peptide A β

1.3.1.1. Métabolisme

Le peptide A β est dérivé d'une protéine transmembranaire de type I : l'« *Amyloid Protein Precursor* » (APP ; Kang et al., 1987, en utilisant la séquence protéique partielle obtenue par Glenner et Wong, 1984; Masters et al., 1985). Le gène de l'APP, situé sur le chromosome 21, code pour 3 isoformes de taille variable, produites par épissage alternatif (695-770 aa). Tandis que les isoformes APP751 et APP770 sont exprimées dans différents types cellulaires non-neuronaux, l'expression de l'isoforme APP695 est exclusivement neuronale (Sisodia et al., 1993). L'APP peut être clivé par deux voies métaboliques (Haass et Selkoe, 1993 ; **Figure 5**) :

- **La voie non-amyloïdogénique** fait intervenir successivement l' α -sécrétase et la γ -sécrétase. Le premier clivage par l' α -sécrétase coupe l'APP au sein de la séquence de l'A β ; il en empêche la génération (Sisodia et al., 1990).
- **La voie amyloïdogénique** est initiée par la β -sécrétase (BACE1), qui clive l'APP sur la partie N-terminale de la séquence de l'A β (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999), libérant le fragment membranaire β -CTF. Le clivage de ce fragment par la γ -sécrétase (complexe multi-protéique, dont font partie les présénilines 1 ou 2 ; Edbauer et al., 2003), génère l'A β . Le site de clivage γ en C-ter détermine la taille du peptide A β , les deux formes majoritaires étant l'A β de 40 et l'A β de 42 acides aminés (A β 40 et A β 42, respectivement). La forme A β 42 est moins soluble que la forme A β 40, en raison de la présence additionnelle de deux acides aminés hydrophobes, favorisant son agrégation pathologique (Burdick et al., 1992).

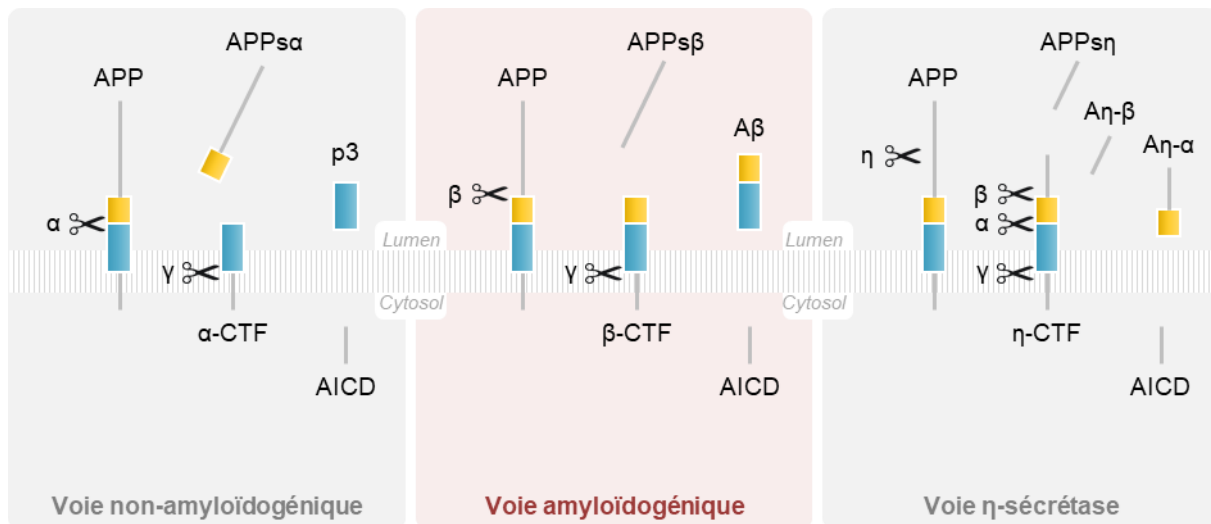


Figure 5 : Clivages protéolytiques de l'APP, selon la voie non-amyloïdogénique (gauche) ou amyloïdogénique (milieu). La voie η-sécrétase, plus récemment décrite et non détaillée dans ce chapitre, est représentée à droite. α : α-sécrétase ; β : β-sécrétase ; γ : γ-sécrétase ; η : η-sécrétase ; APP : protéine précurseur de l'amyloïde ; APPsα : fragment amino-terminal issu du clivage de l'APP par l'α-sécrétase ; α-CTF (ou C83) : fragment carboxy-terminal issu du clivage de l'APP par l'α-sécrétase ; APPsβ : fragment amino-terminal issu du clivage de l'APP par la β-sécrétase ; β-CTF (ou C99) : fragment carboxy-terminal issu du clivage de l'APP par la β-sécrétase ; APPsη : fragment amino-terminal issu du clivage de l'APP par la η-sécrétase ; η-CTF : fragment carboxy-terminal issu du clivage de l'APP par la η-sécrétase ; p3 : peptide Aβ tronqué non pathogénique ; Aβ : peptide β-amyloïde ; Aη-α : peptide issu du clivage de la η-sécrétase puis de l'α-sécrétase ; Aη-β : peptide issu du clivage de la η-sécrétase puis de la β-sécrétase ; AICD : domaine intracellulaire de l'APP.

Figure 5 tirée de Haass et al., 2012 et Willem et al., 2015.

1.3.1.2. Conditions physiologiques

En conditions physiologiques, la voie non-amyloïdogénique prédomine sur la voie amyloïdogénique. L'Aβ est toutefois produit par les cellules, en faibles quantités (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992). Ces quantités physiologiques sont régulées par un équilibre entre la production du peptide et sa clairance (Thal, 2015). La clairance du peptide Aβ repose sur sa dégradation protéolytique par des enzymes gliales, neuronales ou issues de l'espace extracellulaire (Farris et al., 2003; Iwata et al., 2000; Qiu et al., 1998; Thal et al., 2000; Yamaguchi et al., 1998), le drainage du peptide le long des membranes basales périvasculaires (Weller et al., 2008) et son transport vers la circulation sanguine à travers la barrière hémato-encéphalique (Ito et al., 2007; Shibata et al., 2000). L'Aβ a longtemps été considéré comme un déchet métabolique. L'effet délétère de sa délétion expérimentale (Zheng et al., 1995) et la conservation de ce peptide chez l'ensemble des vertébrés (Tharp et Sarkar, 2013) suggèrent pourtant son importance physiologique. Quelques fonctions putatives lui ont été attribuées : l'Aβ exercerait des effets anti-bactériens et oncosuppresseurs, interviendrait dans la

neutralisation de solutés transmis par le sang en cas de rupture de la barrière hémato-encéphalique et modulerait la plasticité synaptique (Brothers et al., 2018).

1.3.1.3. Conditions pathologiques

Accumulation

En conditions pathologiques, l'A β s'accumule dans le milieu extracellulaire parce qu'il est produit de façon excessive (c'est le cas dans les formes génétiques de la maladie) ou mal éliminé (comme dans les formes sporadiques). La clairance des peptides A β 40 et A β 42 a été mesurée chez l'Homme au moyen de marquages radioactifs : il a pu être montré qu'elle était déficiente chez les patients sporadiques, chez qui le rapport production/clairance atteignait 1,37 alors qu'il était de 0,95 chez les témoins (Mawuenyega et al., 2010). La présence concomitante d'une AAC pourrait en outre amplifier ce phénomène, en restreignant la clairance de l'A β des fluides extracellulaires vers les vaisseaux sanguins (Thal et al., 2015).

Agrégation

L'A β est sécrété sous forme de monomères, solubles et non structurés. Pour des raisons qui restent à éclaircir, l'A β peut s'enrichir en **feuilletés β** en conditions aqueuses (Abelein et al., 2014; Barrow et Zagorski, 1991; Kirkitadze et al., 2001; Simmons et al., 1994). Ces changements conformationnels pourraient être secondaires à la concentration locale des peptides A β ou induits par des peptides homologues mal conformés, suivant un mécanisme semblable à celui qui induit la mauvaise conformation du prion (*cf.* chapitre 2). Les feuilletés β se forment majoritairement dans les régions hydrophobes, entre les acides aminés 2 à 21 et 31 à 34 (Kollmer et al., 2019). Le monomère enrichi en feuilletés β tend à se stabiliser par interactions intermoléculaires, conduisant à son **agrégation autologue**. L'agrégation de l'A β engendre la formation de différents assemblages, dont la pertinence physiopathologique reste à définir, allant de l'oligomère plus ou moins soluble (dimères, trimères ou tétramères (Chen et Glabe, 2006; Walsh et al., 2000), pentamères et décamères (Ahmed et al., 2010), dodécamère A β *56 (Lesné et al., 2006)) à la fibre insoluble (protofibrilles (Harper et al., 1997) ou fibres, observées dans les plaques séniles amyloïdes (Gremer et al., 2017; Kollmer et al., 2019; Terry et al., 1964)). Ces différents assemblages, plus ou moins pro-agrégatifs, ne s'intègrent pas nécessairement dans une séquence d'événements linéaires (*cf.* **Annexe 1 : Aspects énergétiques du repliement et de l'agrégation des protéines**).

Toxicité

L'accumulation anormale de l'A β suggère une toxicité par **gain de fonctions**. L'identification de mutations causales provoquant l'accumulation de l'A β , couplée à l'absence de mutation Tau associée à la MA (*cf.* sections 1.3.1.4 et 1.3.2.4.), ont longtemps hissé l'A β à la tête de l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et Higgins, 1992). D'après cette hypothèse, l'accumulation extracellulaire de l'A β est à l'origine de l'ensemble des anomalies associées à la MA, considérées comme étant secondaires. Cette hypothèse présente toutefois des limites (Karran et De Strooper, 2016). La toxicité de l'A β pourrait reposer sur des formes solubles, de plus petite taille. Chez l'Homme, les quantités d'A β soluble sont corrélées à la sévérité de la perte neuronale et du déficit cognitif dans la MA (McLean et al., 1999). L'identification d'oligomères, au degré d'assemblage instable, est toutefois complexe et incertaine. L'A β oligomérique constitue un panel d'espèces moléculaires variées, de toxicité probablement diverse et difficile à appréhender. Selon certains auteurs, la conversion de l'A β soluble en A β fibrillaire insoluble diminue ses effets toxiques (Bieschke et al., 2012). Dans cette hypothèse, la formation de dépôts d'A β est un événement secondaire et protecteur, neutralisant les espèces d'A β solubles dans des agrégats insolubles. Le caractère toxique et pro-agrégatif de ces espèces d'A β solubles ne sont pas nécessairement liés. En outre, les agrégats d'A β ne sont pas inertes mais dynamiques ; ils peuvent constituer des réservoirs libérant des espèces toxiques (Haass et Selkoe, 2007).

1.3.1.4. Génétique

Les mutations associées aux formes familiales de la MA sont autosomiques dominantes et concernent toutes le métabolisme de l'A β . Elles affectent les gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*. Les gènes *PSEN1* et *PSEN2* codent respectivement pour les Préséniline-1 et Préséniline-2, sous-unités du complexe γ -Sécrétase impliqué dans le clivage de l'APP et la génération de l'A β (*cf.* base de données Alzforum ; <https://www.alzforum.org/mutations>).

- **Les mutations ou microduplications du gène *APP***. A ce jour, environ 40 mutations de l'APP ont été décrites. Certaines de ces mutations sont localisées aux sites de clivage β - ou γ -Sécrétase et favorisent la production d'A β ou augmentent le rapport A β ₄₂/A β ₄₀, comme les mutations Londoniennes (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991). D'autres (comme les mutations Islandaise, Taiwanaise et Louvaniste) sont localisées au sein de la séquence de l'A β ; elles augmentent son caractère hydrophobe et favorisent son agrégation. Des mutations situées dans le segment juxta-membranaire

extracellulaire de l'APP sont souvent associées à des formes d'AAC familiales (comme les mutations Flamande, Italienne, Néerlandaise et Iowienne). Des microduplications du locus APP ont plus récemment été identifiées et induisent une augmentation de l'expression de l'APP, à l'origine d'une production accrue d'A β (Rovelet-Lecrux et al., 2006).

- **Les mutations des gènes *PSEN1* et *PSEN2*.** Plus de 300 mutations de *PSEN1* et environ 40 mutations de *PSEN2* ont été décrites. La majorité de ces mutations tendent à augmenter le rapport A β 42/A β 40 en favorisant la production d'A β 42, plus enclin à l'agrégation du fait de son hydrophobicité accrue.

1.3.2. La protéine Tau

1.3.2.1. Expression

La protéine Tau est codée par le gène *MAPT* (Microtubule Associated Protein Tau), localisé au niveau de la bande chromosomique 17q21 (Neve et al., 1986). L'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 génère **six isoformes**, dont l'expression neuronale varie selon le stade développemental (Goedert et al., 1989). La protéine Tau pleine longueur est composée d'une région N-terminale, d'une région riche en proline, d'une région à trois ou quatre répétitions « R » de motifs de liaison aux microtubules et d'une région C-terminale. Les six isoformes se distinguent par la longueur de la région N-terminale (0N, 1N ou 2N) et par la présence de 3 ou 4 motifs de répétition (3R ou 4R ; **Figure 6**). Les modifications post-traductionnelles principales de la protéine Tau consistent en sa phosphorylation : 85 sites de phosphorylation putatifs ont été dénombrés, dont 80 sérine ou thréonine et 5 tyrosine (Wang et Mandelkow, 2016).

1.3.2.2. Conditions physiologiques

La protéine Tau est un constituant normal du cytosquelette, associé aux microtubules (Weingarten et al., 1975). Principalement exprimée dans les neurones, Tau est localisée au niveau de l'axone (Binder et al., 1985), suite à un tri subcellulaire assuré au niveau du segment initial de l'axone (Zempel et al., 2017). La protéine Tau comprend deux domaines fonctionnels : le domaine de projection N-terminal et le domaine d'assemblage des microtubules C-terminal (Wang et Mandelkow, 2016). Le domaine C-terminal interagit avec les microtubules via la région à répétitions (3R ou 4R) et leurs régions bordantes tel une « mâchoire » ; il stimule



Figure 6 : Le gène *MAPT* humain et les six isoformes de protéines Tau obtenues par épissage alternatif. Le gène *MAPT* codant la protéine Tau humaine contient 16 exons. Les exons 0 (E0) et E14 codent des séquences non traduites. Le codon d'initiation de la traduction ATG se trouve dans E1. E1, E4, E5, E7, E9, E11, E12 et E13 sont constitutifs, tandis que E4a, E6 et E8 sont transcrits uniquement dans le tissu périphérique. E2, E3 et E10 sont soumis à un épissage alternatif à l'origine des six isoformes de Tau dans le cerveau humain, qui diffèrent en fonction de la présence de 0, 1 ou 2 inserts à l'extrémité amino-terminale (0N, 1N ou 2N, respectivement) et de la présence ou non du motif de répétition R2, donnant 3 ou 4 domaines de répétition à l'extrémité carboxy-terminale (3R ou 4R, respectivement).

Figure 6 tirée de Wang and Mandelkow, 2016 ; d'après Goedert et al., 1989.

l'assemblage des microtubules et les stabilise (Preuss et al., 1997). Le domaine N-terminal projette à distance des microtubules et permet, avec la région riche en proline, l'organisation parallèle et l'espacement des microtubules (Chen et al., 1992). Tau est impliquée dans le maintien de l'organisation labile de l'extrémité positive des microtubules, peut-être davantage que dans leur stabilisation (Qiang et al., 2018). Le domaine N-terminal est capable d'interactions protéiques ; Tau intervient notamment dans le transport axonal en s'associant à des protéines motrices (Kinésine-1, complexe Dynactine/Dynéine ; Magnani et al., 2007; Utton et al., 2005) et structure l'architecture neuronale en interagissant avec le cytosquelette (Actine, Spectrine, Neurofilaments ; Aamodt et Williams, 1984; Carlier et al., 1984; Henríquez et al., 1995) et la membrane plasmique (Brandt et al., 1995). Les fonctions de Tau sont dynamiquement régulées, principalement par phosphorylation (Lindwall et Cole, 1984; Reynolds et al., 2008; Selden et Pollard, 1983), également par sa condensation à la surface des microtubules sous forme d'îlots, qui protègent localement les microtubules de leur dégradation

protéolytique et modulent l'activité de protéines motrices (Siahaan et al., 2019; Tan et al., 2019).

1.3.2.3. Conditions pathologiques

Accumulation de Tau-p

L'accumulation de Tau-p observée dans la MA (Grundke-Iqbal et al., 1986b; Kopke et al., 1993) témoigne d'un déséquilibre entre l'action de kinases et de phosphatases (Gong et al., 1993). La modification de l'état de phosphorylation de Tau modifie ses interactions avec ses partenaires moléculaires et provoque un ensemble d'anomalies cellulaires. L'affinité de Tau-p pour les microtubules diminue fortement (Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993). La protéine Tau-p est, de plus, sujette à un mauvais adressage subcellulaire, à l'origine de son accumulation anormale dans le compartiment somato-dendritique parallèle à sa raréfaction axonale (Zempel et al., 2017). En outre, l'hyperphosphorylation de Tau empêche sa dégradation protéolytique par le protéasome (Poppek et al., 2006). Ces événements ont pour effet l'accumulation somato-dendritique de Tau-p.

Agrégation

Après s'être accumulée, la protéine Tau-p s'agrège (Braak et al., 1994). Cette agrégation est induite par un changement conformationnel de la protéine, qui conduit à un enrichissement en **feuilletts β** (Von Bergen et al., 2005). Les séquences (275)VQIINK(280) et (306)VQIVYK(311) jouent un rôle crucial dans ce mauvais repliement (Von Bergen et al., 2001, 2000). La modification de la conformation protéique est favorisée par la phosphorylation anormale de certains sites de Tau (*e. g.* Ser202, Thr205, Ser208) alors que le site Ser262 doit être déphosphorylé (Chukwu et al., 2018; Despres et al., 2017). Des partenaires moléculaires, négativement chargés (*e. g.* héparine, acide arachidonique, acides nucléiques), peuvent également moduler le repliement de la protéine en compensant les charges positives répulsives abondantes dans la région à répétitions (Kampers et al., 1996; Paudel et Li, 1999; Wilson et Bindert, 1997). Des données plus récentes suggèrent la possibilité d'une transmission du mauvais repliement de Tau-p à des protéines homologues, à la manière d'un prion (*cf.* chapitre 2). La protéine Tau enrichie en feuilletts β présente des séquences hydrophobes exposées, favorisant des **interactions intermoléculaires**. Différents types d'assemblages, aux implications physiopathologiques méconnues, ont été décrits. La protéine Tau peut constituer des dimères (Kim et al., 2015) ou trimères solubles (Mirbaha et al., 2015), des oligomères de

plus grande taille (Wu et al., 2013) pouvant s'organiser en protofibrilles (Jackson et al., 2016) ou en PHF observés dans les DNF (Falcon et al., 2018b; Kidd, 1963). Les assemblages que nous venons de décrire n'apparaissent pas nécessairement selon une séquence d'événements linéaires (*cf.* **Annexe 1 : Aspects énergétiques du repliement et de l'agrégation des protéines**), comme nous l'avons déjà noté pour les assemblages d'A β .

Toxicité

La pathologie Tau est associée à une neurotoxicité comme en témoignent les corrélations entre les symptômes et l'accumulation de Tau (Nelson et al., 2012) ou l'observation de DNF fantômes (*i.e.* extracellulaires). Mais corrélation ne signifie pas causalité et il est difficile de déterminer à quel niveau de son évolution la pathologie Tau est toxique. Le décrochage de Tau des microtubules est à l'origine d'altérations par **perte de fonctions** : la déstabilisation du réseau microtubulaire induite (Del Alonso et al., 1996, 1994) a pour résultat une altération du transport axonal et un dysfonctionnement synaptique, pouvant précéder la mort du neurone (Mandelkow et al., 2003). La souris transgénique *MAPT*^{-/-} (tg *MAPT*^{-/-}) est toutefois viable et phénotypiquement normale, suggérant la possibilité de voies vicariantes (Harada et al., 1994). La relocalisation somato-dendritique de la protéine Tau en conditions pathologiques suggère également une toxicité par **gain de fonctions**. L'accumulation intra-neuronale de Tau-p est notamment associée à une altération du protéasome, conduisant à un dysfonctionnement cellulaire global (Keck et al., 2003; Myeku et al., 2016). Les caractères toxique et pro-agrégatif de Tau-p ne concernent pas nécessairement les mêmes espèces moléculaires. Chez la souris tg *MAPT*, les déficits cognitifs observés sont atténués en inhibant l'expression de Tau malgré la persistance d'agrégats intra-neuronaux insolubles (Van Der Jeugd et al., 2012). Les formes de Tau-p solubles sont plus toxiques que les formes davantage agrégées et insolubles (D'Orange et al., 2018). Les assemblages plus complexes de Tau peuvent être tardifs et protecteurs, en neutralisant par agrégation les espèces toxiques. Ces agrégats n'étant toutefois pas inertes, leur capacité à relarguer des espèces ou fragments de Tau toxiques n'est pas à exclure.

1.3.2.4. Génétique

A ce jour, aucune mutation associée à la MA n'a été identifiée sur le gène *MAPT*. Environ 80 mutations pathologiques ont été décrites (<https://www.alzforum.org/mutations>), mais induisent d'autres tauopathies dites primaires, non associées à la pathologie A β . Ces tauopathies

présentent des caractéristiques différentes de celle observée dans la MA (entre autres, démence fronto-temporale, dégénérescence cortico-basale, paralysie supranucléaire progressive, maladie des grains argyrophiles, maladie de Pick ; cf. **Annexe 2 : Tauopathies**). Les mutations peuvent modifier la séquence de la protéine, ses propriétés agrégatives et son affinité pour les microtubules. Elles peuvent être introniques et déréguler l'épissage (« *splicing* ») de l'ARN de Tau, ce qui change le rapport des niveaux d'expression de Tau 3R et de Tau 4R (Spillantini et Goedert, 2013).

Résumé du chapitre 1

- La MA se manifeste cliniquement par un ensemble de symptômes cognitifs, dont un syndrome amnésique hippocampique caractéristique. Ces symptômes évoluent et s'intensifient progressivement, pour aboutir à un syndrome démentiel.
- Deux types d'anomalies neuropathologiques caractérisent la MA : les dépôts d'A β , causés par l'accumulation extracellulaire du peptide A β (pathologie A β) et les lésions neurofibrillaires, dues à l'accumulation intraneuronale de protéines Tau-p (DNF dans le péricaryon, fibres tortueuses dans les dendrites, couronne neuritique de la plaque sénile, principalement constituée d'axones ; pathologie Tau). Ces anomalies correspondent aux lésions neuropathologiques de la MA (« *AD neuropathologic changes* ») et peuvent être présentes en nombre limité au stade préclinique de la MA.
- Le peptide A β et la protéine Tau-p anormalement accumulés peuvent tous deux s'enrichir en feuillets β et s'auto-agréger. La mauvaise conformation responsable de l'agrégation peut se propager à d'autres protéines homologues. Les protéines mal conformées se comportent donc comme de véritables protéines infectieuses : c'est le concept du prion (Prusiner, 1982).

2. Prion, type-prion et propagon

2.1. Le concept de prion

2.1.1. Un agent transmissible non conventionnel

Les maladies à prions, ou Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST), sont des affections neurodégénératives rares du système nerveux central dont la particularité est d'être **transmissibles**. Décrite pour la première fois au 18ème siècle, la tremblante du mouton est la première ESST étudiée. Son caractère transmissible a été démontré chez le mouton : l'inoculation intraoculaire d'extraits d'encéphale ou de moelle épinière dérivés d'un congénère malade permet la transmission de la maladie (Cuillé et Chelle, 1936). L'agent infectieux est filtrable et nécessite une longue période d'incubation pouvant atteindre deux ans (Cuillé et Chelle, 1938), ce qui a conduit à considérer initialement la tremblante comme une « maladie virale à évolution lente » (Sigurdsson, 1954). Chez l'Homme, la première ESST identifiée fut le Kuru (Gajdusek et Zigas, 1957). Aujourd'hui disparu, le Kuru affectait les femmes et les enfants du peuple Fore en Papouasie-Nouvelle-Guinée, qui consommaient le corps des défunts – à l'exception de la vésicule biliaire, jugée trop amère – lors de rituels cannibales funéraires (Mathews et al., 1968). La transmissibilité du Kuru fut démontrée par l'inoculation intracérébrale d'un broyat encéphalique dérivé de cas humains chez le chimpanzé. L'affection survint 7 fois sur 8, après une incubation de 18 à 30 mois (Gajdusek et al., 1967, 1966; Hadlow, 1959). Une parenté pathologique a été soulignée entre le Kuru expérimental du chimpanzé, le Kuru et la tremblante : ces maladies présentaient une **triade lésionnelle** commune (spongiose massive et caractéristique, perte neuronale et gliose moins spécifiques), parfois accompagnée de plaques amyloïdes extracellulaires comme dans le Kuru (Beck et al., 1966). Des études menées sur la tremblante ont permis de préciser la nature de l'agent transmissible : plus petit qu'un virus (Alper et al., 1966), sa résistance aux radiations ionisantes a suggéré qu'il était, en outre, dépourvu d'acides nucléiques (Alper et al., 1967). L'hypothèse « prion » (pour « *proteinaceous infectious particles* ») a été formulée par Prusiner : elle stipule que l'agent transmissible est une protéine que l'on peut qualifier d'infectieuse malgré l'absence d'acides nucléiques (Prusiner, 1982). Cette protéine infectieuse, nommée PrP pour protéine du prion, est une protéine de l'hôte produite en conditions physiologiques, présentant une conformation anormale en conditions pathologiques (Bolton et al., 1982; Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985). Ce mauvais repliement (« *misfolding* ») est à l'origine des propriétés physico-chimiques anormales et de l'infectiosité du prion.

2.1.2. Encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles

Chez l'animal, des ESST analogues à la tremblante du mouton ont notamment été observées chez les bovins (encéphalopathie spongiforme bovine ou maladie de la vache folle), cervidés (maladie du dépérissement chronique), félins (encéphalopathie spongiforme féline) ainsi que chez le vison (encéphalopathie du vison). Chez l'Homme, la liste des maladies à prions comprend, en plus du **Kuru**, la maladie de **Creutzfeldt-Jakob** (Gibbs et al., 1968) ainsi que le syndrome de **Gerstmann-Straüssler-Scheinker** (Masters et al., 1981) et l'**insomnie fatale familiale** (Medori et al., 1992), la première étant la plus fréquente et souvent sporadique, les deux dernières plus rares et transmises de façon génétique. Toutes débutent par une longue phase d'incubation asymptomatique, suivie d'une phase clinique progressive aboutissant à la mort du patient, souvent en quelques mois (non détaillée ici). La maladie de Creutzfeldt-Jakob a pu se transmettre, notamment par l'injection d'hormones de croissance d'origine cadavérique ou l'utilisation de dures-mères lyophilisées contaminées (Brown et al., 2012). Il était généralement admis qu'une **barrière d'espèce** limitait la possibilité d'une contamination inter-espèce. Elle peut cependant être franchie comme ce fut le cas lors de l'épidémie de la vache folle dans les années 1990 : la consommation de tissus infectieux avait provoqué chez l'Homme l'apparition d'une maladie de Creutzfeldt-Jakob aux caractéristiques particulières (« nouveau variant »).

2.1.3. Mode d'action du prion

2.1.3.1. PrPc versus PrPsc

Comment une protéine endogène à la séquence en acides aminées « normale » peut-elle présenter des propriétés infectieuses ? La PrP est une glycoprotéine membranaire exprimée par l'hôte, pouvant présenter deux types de conformation : la PrPc « cellulaire » physiologique et la PrPsc « scrapie » pathologique (Stahl et Prusiner, 1991). La **PrPc** est codée par le gène *Prnp* situé sur le chromosome 20 (Liao et al., 1986). Son expression est ubiquitaire mais concerne surtout le système nerveux central, où la PrP est principalement produite par les neurones (Kretzschmar et al., 1986). Peu structurée, la PrPc présente un domaine N-terminal désorganisé et un domaine C-terminal globulaire, comportant trois hélices α et un court feuillet β antiparallèle (Zahn et al., 2000). Ses fonctions physiologiques sont mal connues. La déplétion de la PrPc chez la souris ZH3 entraîne une démyélinisation périphérique chronique, suggérant

a Modèles de conversion théoriques

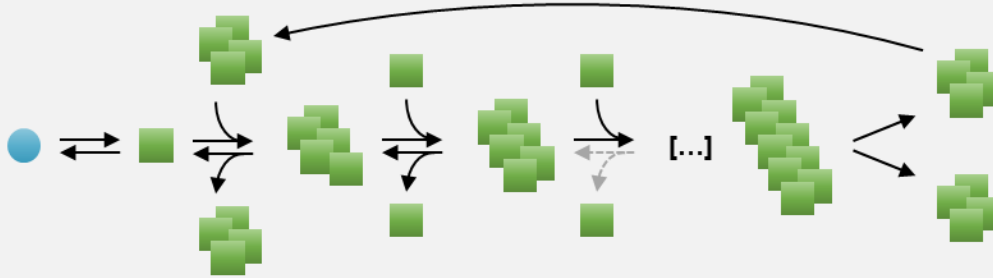
Conversion par nucléation et polymérisation



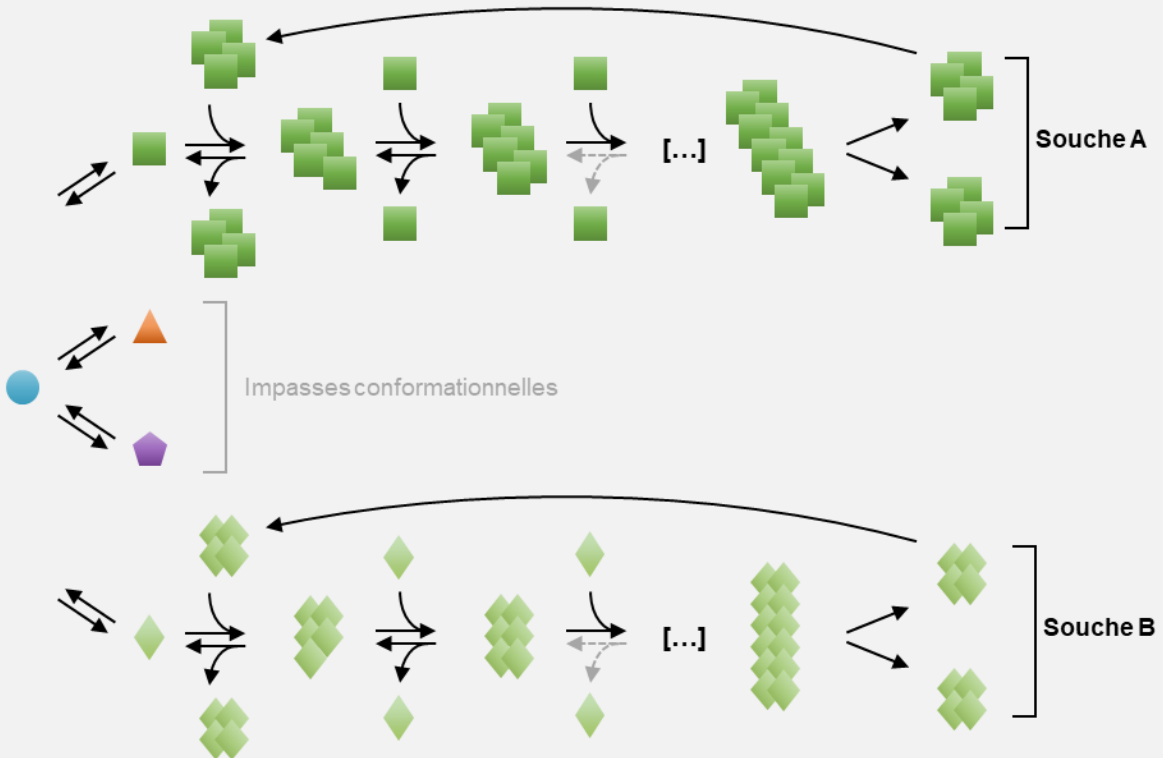
Conversion par nucléation assistée



b Nucléation, élongation et propagation



c Notion de souche



● PrPc (■◆) PrPsc ● Facteur de conversion ■ PrP intermédiaire (▲▼) PrP de conformations alternatives

Figure 7 : Mode d'action du prion. a) Exemples de modèles théoriques de conversion des prions. Le modèle de conversion par nucléation propose que la PrPc et la PrPsc sont en équilibre dynamique. La PrPsc monomérique, instable, se stabilise par la formation d'un oligomère qui, tel une amorce de nucléation, lie et stabilise davantage

les PrPsc monomériques. L'équilibre se déplace alors vers l'accumulation de l'isoforme pathologique PrPsc. Dans un modèle alternatif de conversion par nucléation assistée, la PrPsc n'existe pas en tant que monomère, mais nécessite des réarrangements structuraux consécutifs pour former l'espèce oligomérique PrPsc. La première étape est la formation d'un intermédiaire partiellement déplié (PrP*) via l'interaction de la PrPc avec un facteur de conversion endogène. Ce changement structural permet l'exposition de séquences hydrophobes, facilitant les interactions entre PrP*. Si la PrP* est présente en quantité suffisante, elle forme un oligomère stable correspondant à la PrPsc, qui agit comme une molécule infectieuse catalysant le recrutement et la conversion de PrP*. b) Quel que soit le mode de conversion en jeu, il en résulte la formation de PrPsc infectieuses qui constituent des amorces de nucléation catalysant le recrutement de PrP (nucléation), à l'origine d'assemblages de plus en plus grands et stables (élongation). La fragmentation de ces assemblages conduit à la dissémination de nouvelles amorces (propagation). c) Une protéine peut adopter différents états conformationnels. Certains d'entre eux sont associés à des propriétés infectieuses et aboutissent à des assemblages de structures distinctes, via des interactions intermoléculaires thermodynamiquement stables. Le maintien fidèle de la structure intrinsèque des amorces de nucléation est assuré par des interactions intermoléculaires structurellement bien définies et spécifiques que les amorces établissent avec des monomères nouvellement recrutés et compatibles sur le plan conformationnel. Les états conformationnels différents de la PrPc native – physiologiquement active – ne sont pas toujours stables, ni pathogéniques (impasses conformationnelles).

Figure 7 tirée de Abid et Soto, 2006 et Melki, 2018.

un rôle de la PrPc dans le maintien de la myéline périphérique (Nuvolone et al., 2016). La PrPc aurait également des propriétés antioxydantes, en agissant en tant que chélateur d'ions Cu^{2+} et en limitant la production de radicaux libres (Viles et al., 2008). La **PrPsc** est codée par le même gène que la PrPc (Basler et al., 1986) et toutes deux présentent la même séquence d'acides aminés et les mêmes modifications post-traductionnelles. Ces deux protéines ne diffèrent que par leurs structures secondaire et tertiaire (Stahl et Prusiner, 1991). La PrPsc présente un enrichissement en feuillets β (Pan et al., 1993), à l'instar de l'A β et de la Tau-p anormalement repliés dans la MA.

2.1.3.2. Conversion, agrégation et propagation

Observations expérimentales

L'absence d'expression de la PrPc chez la souris transgénique *Prnp*^{-/-} lui confère une résistance au prion (Büeler et al., 1993). L'inoculation intracérébrale d'un prion de synthèse, produit à partir de PrPc murines recombinantes et fibrillisées *in vitro*, suffit à transmettre la maladie chez la souris (Legname et al., 2004). Le mécanisme d'action du prion nécessite donc 1) un agent infectieux (la PrPsc) et 2) son substrat endogène (la PrPc). Ces conclusions ont été

corroborées *in vitro* : la PrP^{sc} synthétique, mise en contact de protéines PrP^c recombinantes, induit leur conversion en PrP^{sc} capable de s'auto-agréger (Saborio et al., 2001).

Conversion

Le caractère infectieux de la PrP^{sc} repose sur sa capacité à convertir la PrP^c en PrP^{sc}, par transmission de son mauvais repliement. Le mécanisme sous-jacent reste méconnu. Différents modèles théoriques ont toutefois été proposés (Abid et Soto, 2006 ; **Figure 7a**).

- **Le modèle de nucléation-polymérisation**

D'après ce modèle, la PrP^c est en équilibre dynamique avec la PrP^{sc} monomérique, instable et par conséquent transitoire et minoritaire. La PrP^{sc} monomérique instable tend à établir des interactions intermoléculaires et forme des oligomères. Ces oligomères constituent des amorces de nucléation catalysant l'incorporation et la stabilisation d'autres PrP^{sc} monomériques. L'équilibre entre les formes PrP^c et PrP^{sc} est ainsi déplacé en faveur de l'accumulation de PrP^{sc} monomériques, dont la polymérisation se poursuit. Dans les formes sporadiques de maladies à prions, la conversion de PrP^c en PrP^{sc} serait spontanée. Les mutations du gène *Prnp* affecteraient la conformation de la PrP et favoriseraient son mauvais repliement, dans les maladies à prions familiales. Lors d'une contamination, l'introduction d'amorces de nucléation catalyserait la conversion de PrP^c en PrP^{sc}.

- **Le modèle de nucléation assistée**

Dans ce modèle alternatif, la conversion de la PrP^c en PrP^{sc} passerait par un état structural intermédiaire, la PrP^{*}. La PrP^{*} serait issue de l'association de la PrP^c et d'un cofacteur endogène, facilitant la conversion de PrP^c en PrP^{sc} en abaissant l'énergie nécessaire. L'existence de cofacteurs, non identifiés, est suspectée : tandis que l'expression de la PrP^c est ubiquitaire, la vulnérabilité des tissus face au prion est variable. Des cofacteurs polyanioniques ont été caractérisés *in vitro* (Fernández-Borges et al., 2018), mais leur pertinence physiologique reste à démontrer. La PrP^{sc} obtenue, instable, tend à s'oligomériser et constitue des amorces de nucléation, catalysant la conversion de PrP^{*} en PrP^{sc}. Dans les formes sporadiques de maladies à prions, la transition entre la PrP^c et la PrP^{*} serait spontanée et aléatoire. Les mutations du gène *Prnp* faciliteraient cette transition dans les maladies à prions familiales. En cas de contamination, l'introduction d'amorces de nucléation favoriserait la conversion de PrP^{*} en PrP^{sc}.

Agrégation

Quel que soit le mécanisme de conversion, la PrP^{sc} mal repliée s'accumule et s'agrège. A l'instar de l'A β et de la Tau-p, différentes espèces d'agrégats se forment, allant de l'oligomère amorphe au polymère fibrillaire plus insoluble (*cf. Annexe 1 : Aspects énergétiques du repliement et de l'agrégation des protéines*).

Propagation

La **fragmentation** d'agrégats de PrP^{sc} conduit à la dissémination de nouvelles amorces de nucléation. En initiant de nouveaux cycles de nucléation-fragmentation à distance, ces fragments permettent la propagation du prion (Knowles et al., 2009). Ce processus est à l'origine de l'expansion lésionnelle observée et, par extension, de la progression des symptômes cliniques (**Figure 7b**).

2.1.3.3. Multirésistance

L'activité pathogénique de la PrP^{sc} résiste à la plupart des méthodes d'inactivation des agents pathogènes conventionnels. Les ultrasons, les rayonnements ionisants et non ionisants, les nucléases, le formaldéhyde et les détergents sont inefficaces (Dickinson et Taylor, 1978). D'autre part, le mauvais repliement de la PrP^{sc} lui confère une résistance partielle à la dégradation protéolytique par la Protéinase K. L'analyse en Western blot du profil de digestion de la PrP par la Protéinase K constitue d'ailleurs l'un des outils diagnostiques utilisés en routine afin de détecter la présence de PrP^{sc} dans des homogénats cérébraux ou cérébelleux.

2.1.3.4. Notion de souche

Comment un agent infectieux unique peut-il engendrer la diversité clinico-pathologique des maladies à prions ? La conformation de la PrP^{sc} est à l'origine de son caractère pathogénique. Or, la PrP^{sc} peut adopter non pas une, mais plusieurs conformations pathologiques aux caractéristiques structurales et fonctionnelles uniques. Ces caractéristiques ont la particularité d'être conservées à l'issue d'expériences d'inoculation en série. On parle alors de « **souches** » de prions qui régissent l'infectiosité du prion, le type d'agrégats formés, la morphologie des lésions neuropathologiques, leur topographie et, *in fine*, le profil clinico-pathologique obtenu (**Figure 7c**).

2.2. La maladie d'Alzheimer vue sous l'angle du prion

2.2.1. Les origines d'un nouveau paradigme

Dès la formulation de l'hypothèse prion, Prusiner rapprochait les maladies à prions à d'autres protéinopathies neurodégénératives, dont la MA : « *A knowledge of the molecular structure of prions may help identify the etiologies of some chronic degenerative diseases of humans. [...] Diseases where prions might play an etiological role include Alzheimer's senile dementia, [...]* » (Prusiner, 1982). La transmissibilité de la MA a été testée par inoculation intracérébrale d'homogénats de cerveaux Alzheimer chez le primate non humain, par analogie au domaine prion. Malgré des premiers essais infructueux (Goudsmit et al., 1980), l'expérience fut réitérée chez le marmouset, avec une période d'incubation de six à sept ans à l'issue de laquelle des dépôts d'A β parenchymateux et vasculaires furent détectés dans le cerveau d'animaux inoculés (Baker et al., 1994). Les résultats obtenus passèrent cependant inaperçus, dans un contexte marqué par l'essor de la cascade amyloïde (Hardy et Higgins, 1992). L'apparition de souris transgéniques humanisées pour l'*APP* ou *MAPT*, susceptibles de développer les pathologies A β ou Tau, contribua finalement à relancer l'hypothèse prion :

- L'inoculation d'homogénats de cerveaux Alzheimer en intracérébral suffit à induire la pathologie A β chez la souris tg *APP* (Suédoise) avant l'apparition de la pathologie endogène (Kane et al., 2000; Meyer-Luehmann et al., 2006; Walker et al., 2002).
- L'injection intracérébrale d'homogénats de cerveaux de souris tg *MAPT* (P301S) ou de cerveaux Alzheimer déclenche la pathologie Tau chez la souris tg *MAPT* (Clavaguera et al., 2013, 2009).

Ces données, en faveur d'une transmissibilité des pathologies A β et Tau, donnèrent une nouvelle actualité à l'hypothèse prion de la MA.

2.2.2. Analogies entre le prion et l'A β

2.2.2.1. La pathologie A β est-elle transmissible ?

In vitro, l'A β peut constituer des amorces de nucléation qui catalysent son agrégation, en deçà de concentrations correspondant à son seuil d'agrégation spontanée (Lomakin et al., 1996; Petkova et al., 2005). La technique de rt-QuIC (pour « *real-time quaking-induced conversion* »), issue du domaine prion, a été adaptée au peptide A β afin de détecter *in vitro* et en temps réel la fibrillisation de monomères d'A β 42 recombinants, en mesurant la fluorescence

émise par la thioflavine-T au contact de feuillet β . L'ajout d'oligomères d'A β , synthétiques ou provenant du liquide céphalorachidien de cas de MA probables, a induit l'agrégation de ces monomères (Salvadores et al., 2014), bien que ces données n'aient pas été reproduites à ce jour. L'inoculation intracérébrale d'homogénat de néocortex Alzheimer chez la souris tg *APP* (Suédoise) induit *in vivo* l'agrégation de l'A β endogène à proximité du site d'injection, puis à distance de celui-ci (Kane et al., 2000; Meyer-Luehmann et al., 2006; Walker et al., 2002). La pathologie A β peut être également transmise expérimentalement par voies périphériques : l'injection intra-péritonéale (Eisele et al., 2014, 2010) ou intraveineuse (Burwinkel et al., 2018) d'homogénats corticaux de cerveaux Alzheimer permet la formation de dépôts parenchymateux ou vasculaires chez différentes lignées tg *APP*. En revanche, le recours aux voies d'inoculation orale, intranasale et intraoculaire ne permet pas la transmission expérimentale de la pathologie A β (Eisele et al., 2009). Chez l'Homme, plusieurs cas de contamination iatrogène ont été décrits. Dans les années 1980, un traitement à l'hormone de croissance d'origine cadavérique était administré en sous-cutané à des enfants déficitaires. Des lots d'hormones contaminés par le prion ont provoqué le développement d'une maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène fatale, après une période d'incubation allant jusqu'à trois décennies. La présence concomitante de dépôts d'A β parenchymateux et vasculaires a été observée en *post-mortem* chez les cas associés à des périodes d'incubation d'au moins deux décennies (Cali et al., 2018; Duyckaerts et al., 2018; Jaunmuktane et al., 2015; Purro et al., 2018; Ritchie et al., 2017). L'AAC massive et létale observée dans le cerveau de sujets jeunes, dépourvus de mutation des gènes *APP*, *PS1* ou *PS2* et soumis à une greffe de dure-mère dans leur enfance, suggère également la possibilité d'une contamination par le greffon d'origine cadavérique (Banerjee et al., 2019; Frontzek et al., 2016; Hamaguchi et al., 2016; Hervé et al., 2018; Iwasaki et al., 2018; Kovacs et al., 2016b). Des observations similaires ont été rapportées chez des patients ayant subi un acte neurochirurgical trois décennies avant leur décès, indiquant la possibilité d'une transmission de la pathologie A β par du matériel chirurgical contaminé (Giaccone et al., 2019; Jaunmuktane et al., 2018). La pathologie A β serait donc transmissible chez l'Homme à la manière d'un prion, dans des conditions particulières (injection ou neurochirurgie). Cette transmission est, de plus, limitée : elle n'engendre pas le profil clinico-neuropathologique complet de la MA, malgré des temps d'incubation particulièrement longs.

2.2.2.2. Quelles espèces d'A β peuvent induire la pathologie ?

La pathologie A β induite chez l'animal par l'injection d'homogénats corticaux de cerveaux Alzheimer est d'autant plus importante que la concentration en A β administrée est

élevée. L'immunodéplétion de l'A β des homogénats injectés abolit l'induction de la pathologie (Meyer-Luehmann et al., 2006). Toutefois, l'A β contenu dans le liquide céphalo-rachidien de patients Alzheimer n'induit pas l'apparition de dépôt dans le parenchyme de souris tg *APP* (Suédoise), après inoculation intracérébrale (Fritschi et al., 2014). L'A β est donc susceptible d'induire expérimentalement une agrégation d'A β parenchymateuse ou vasculaire, mais sa capacité à ensemercer la pathologie est restreinte à quelques espèces moléculaires, dont les caractéristiques (degré d'assemblage et conformation) restent encore mal connues. Des fibres d'A β synthétiques peuvent initier la formation de dépôts d'A β parenchymateux chez la souris tg *APP* (Suédoise) (Stöhr et al., 2014). Les oligomères d'A β solubles sont plus actifs que les assemblages fibrillaires insolubles (Langer et al., 2011). Cette différence est probablement due à une plus grande instabilité des formes oligomériques, plus enclines à établir des interactions intermoléculaires, ou à un plus grand nombre d'entités actives dans des préparations oligomériques plutôt que fibrillaires, à quantités d'A β égales. La conformation de l'A β influence également sa capacité d'ensemencement ; le prétraitement de l'A β à l'acide formique inhibe l'induction de pathologie A β *in vivo* (Meyer-Luehmann et al., 2006). Les propriétés d'ensemencement de l'A β ne semblent pas réservées à une seule conformation (Heilbronner et al., 2013). A la manière du prion, l'activité des espèces d'A β pathogéniques résiste à la fixation par le formaldéhyde (Fritschi et al., 2014), à l'action de la Protéinase K (Langer et al., 2011) et aux températures élevées (Meyer-Luehmann et al., 2006), et persiste dans le temps (Ye et al., 2015).

2.2.2.3. Existe-t-il un effet souche pour l'A β ?

L'observation de fibres synthétiques d'A β 40 en microscopie électronique et en microscopie à force atomique révèle un polymorphisme structural. Les différentes fibres identifiées peuvent incorporer des monomères d'A β 40 en répliquant leurs caractéristiques morphologiques (Petkova et al., 2005). Des extraits de cerveaux Alzheimer issus de cas sporadiques ou porteurs des mutations « Suédoise » ou « Arctique » ont été injectés en intracérébral chez la souris tg *APP* (Suédoise). Contrairement aux souris injectées avec des homogénats de cas sporadiques ou présentant la mutation Suédoise, les souris inoculées par des homogénats dérivés du patient Arctique présentaient une AAC prédominante composée majoritairement d'A β 38, similaire à la pathologie observée chez le patient. Ces profils lésionnels distincts sont maintenus après un deuxième passage chez la souris naïve (Watts et al., 2014). Chez l'Homme, les dépôts d'A β présentent des propriétés variables entre individus. Les différences portent sur la structure évaluée par résonance magnétique nucléaire (Qiang et al., 2017), l'affinité vis-à-vis de

radioligands (Rosen et al., 2010) ou la morphologie lésionnelle (Crook et al., 1998; Le et al., 2001; Philipson et al., 2012). Des différences structurales de l'A β sont observées entre les maladies d'Alzheimer d'évolution normale (environ 10 ans) ou rapide (environ 2 ans). Une souche d'A β plus agressive pourrait être à l'origine des formes de MA rapidement progressives (Cohen et al., 2016; Qiang et al., 2017). Collectivement, ces données suggèrent l'existence de souches d'A β stables, dont les variations conformationnelles génèrent des assemblages protéiques de structures distinctes. Un tel effet souche peut être à l'origine des variants clinico-pathologiques rencontrés dans la MA, mais l'association entre les propriétés moléculaires de l'A β et les profils clinico-pathologiques reste à éclaircir.

2.2.3. Analogies entre le prion et la Tau

2.2.3.1. La pathologie Tau est-elle transmissible ?

Le cerveau de patients Alzheimer comporte des espèces de Tau qui, telles des amorces de nucléation, provoquent en rt-QuiC l'agrégation de protéines Tau monomériques en fibres amyloïdes thioflavine-T positives (Kraus et al., 2019). Des agrégats de protéines Tau recombinantes peuvent être internalisés par différents modèles cellulaires et initier l'agrégation de protéines Tau intracellulaires (Frost et al., 2009; Guo et Lee, 2011; Kfoury et al., 2012). Les agrégats formés *de novo* sont à leur tour capables d'induire l'agrégation de Tau *in vitro* (Frost et al., 2009; Kfoury et al., 2012). Chez la souris tg *MAPT*, l'injection stéréotaxique d'agrégats de Tau, produits *in vitro* ou extraits *ex vivo* de cerveaux de souris P301S ou de cas de MA, induit l'agrégation intraneuronale de protéines Tau endogènes autour du site d'injection puis à distance de celui-ci. Les agrégats de protéines Tau constituent des amorces de nucléation capables, à la manière de prions, d'initier localement la pathologie Tau et de se propager à distance, en suivant probablement les connexions neuroanatomiques (Clavaguera et al., 2013, 2009; Iba et al., 2013). La transmission expérimentale par voie intra-péritonéale a également été décrite, mais la pathologie Tau induite est alors limitée (Clavaguera et al., 2014). Chez l'Homme, peu de données supportent l'hypothèse d'une transmissibilité de la pathologie Tau. Des accumulations intraneuronales de Tau-p ont été observées dans l'hippocampe et l'isocortex temporal de 3 des 24 cas constituant la cohorte française de patients atteints de maladie de Creutzfeldt-Jakob iatrogène provoquée par le traitement par l'hormone de croissance d'origine cadavérique. Cette pathologie Tau ne concerne qu'un faible nombre de cas et ne s'intègre pas dans un profil clinico-pathologique évocateur d'une MA : les accumulations de Tau-p intraneuronales sont restreintes à l'hippocampe et à l'isocortex temporal, ne sont pas associées

à la présence de dépôts d'A β et ne sont pas accompagnées de symptômes évoquant le syndrome clinique de la MA (Duyckaerts et al., 2018). Ces observations laissent penser que la transmission inter-individuelle humaine de la pathologie Tau, par un mécanisme de type prion, est limitée ou absente.

2.2.3.2. Quelles espèces de Tau peuvent induire la pathologie ?

L'identification des espèces moléculaires les plus enclines à recruter, convertir et agréger les protéines Tau physiologiques chez l'Homme est en cours d'investigation. L'injection intracérébrale de fibres constituées de protéines Tau recombinantes non phosphorylées suffit à déclencher la pathologie Tau chez la souris tg *MAPT* (P301S) (Iba et al., 2013; Stancu et al., 2015). Les fibres de Tau P301S recombinantes, synthétisées *in vitro*, exercent une activité pathogénique bien inférieure à celle des fibres de Tau P301S natives, extraites du cerveau de souris tg *MAPT* (P301S) (Falcon et al., 2015). Ces résultats soulignent l'influence de modifications post-traductionnelles ou de co-facteurs sur la conformation de Tau *in vivo* et, par extension, sur sa propension à induire la pathologie. Les PHF natifs, extraits d'encéphales de cas de MA, induisent l'agrégation de protéines Tau endogènes *in vivo*, après l'inoculation intracérébrale de souris transgéniques (Boluda et al., 2015; Guo et al., 2016) ou même de type sauvage (Audouard et al., 2016). Toutefois, une activité pathogénique a été détectée pour des assemblages plus petits, incluant de courtes fibres (Jackson et al., 2016), des trimères (Mirbaha et al., 2015) ou des dimères de Tau (Kim et al., 2015). Plus récemment, des monomères mal repliés, capables d'amorcer l'agrégation de Tau *in vitro*, ont été identifiés (Mirbaha et al., 2018). Le produit du clivage de Tau en Asp421 pourrait également déclencher l'agrégation de Tau *in vitro* (Nicholls et al., 2017). La pathogénicité de Tau serait régie davantage par sa conformation que par son degré d'assemblage, les séquences (275)VQIINK(280) et (306)VQIVYK(311) occupant probablement un rôle crucial dans l'adoption de la conformation pathogénique (Von Bergen et al., 2001, 2000; Falcon et al., 2015; Fitzpatrick et al., 2017; Mirbaha et al., 2018). L'importance physiopathologique de ce panel d'espèces actives reste à définir. Les agrégats de grande taille, plus stables, seraient moins actifs que les assemblages plus petits (Ghag et al., 2018). A la manière d'un prion, les espèces moléculaires de Tau pathogènes résistent au formaldéhyde, à la Protéinase K et aux détergents (Kaufman et al., 2017; Kraus et al., 2019).

2.2.3.3. Existe-t-il un effet souche pour Tau ?

La protéine Tau peut adopter différentes conformations, à l'origine d'assemblages de structures variées (Sharma et al., 2018). Sanders et al. ont généré des lignées cellulaires exprimant une protéine Tau non physiologique comportant les mutations P301L et V337M, protéine qui s'agrège au contact de fibres de Tau recombinantes. La mauvaise conformation transmise se manifeste par un profil biochimique et morphologique. Ce profil, dépendant de la « souche » initiale de Tau, se transmet au fil de passages cellulaires durant six mois. Des cellules naïves exposées à ces différents agrégats reproduisaient leurs caractéristiques, illustrant *in vitro* la capacité de Tau à constituer des souches stabilisées. L'injection d'extraits de ces lignées dans l'hippocampe de souris tg *MAPT* (P301S) induisait différentes pathologies, maintenues après des inoculations en série (Sanders et al., 2014). La pathologie Tau induite par ces souches, générées expérimentalement, affectait des types cellulaires et des régions cérébrales distincts, en progressant plus ou moins rapidement, et ce de façon plus ou moins agressive (Kaufman et al., 2016). L'observation par cryo-microscopie électronique de protéines Tau issues d'homogénats de cerveaux humains de tauopathies diverses (maladie d'Alzheimer, encéphalopathie traumatique chronique, maladie de Pick) révèle l'existence de différents conformères de la protéine Tau, assemblés en structures fibrillaires spécifiques de la tauopathie analysée (Falcon et al., 2019, 2018b, 2018a; Fitzpatrick et al., 2017). En rt-QuIC, les espèces de Tau actives contenues dans des homogénats de cerveaux, affectés par la MA ou par d'autres tauopathies dites « primaires », présentent des profils distincts de fibrillation induite (Kraus et al., 2019). L'injection intracérébrale d'homogénats de cerveaux, dérivés de différentes tauopathies, induit une pathologie Tau expérimentale qui récapitule les lésions neuropathologiques associées à la tauopathie inoculée (Boluda et al., 2015; Clavaguera et al., 2013). La protéine Tau peut donc adopter différentes conformations, à l'origine de pathologies aux propriétés biochimiques, morphologiques et topographiques distinctes (Melki, 2018a). Ces propriétés sont stables et persistent après des expositions ou inoculations en série, *in vitro* et *in vivo*. La diversité des tauopathies observées chez l'Homme pourrait être due à l'existence de différentes souches de protéines Tau pathologiques.

2.3. Les limites de l'hypothèse prion : nuances et propagons

2.3.1. Les limites de l'hypothèse prion

En dépit des similitudes constatées entre les maladies à prions et la MA, le parallèle établi présente des limites. Le caractère transmissible de la MA n'a pas été confirmé chez l'Homme : les données épidémiologiques ne permettent pas aujourd'hui de soupçonner une origine infectieuse de la maladie et aucune contamination inter-systémique ou inter-individuelle n'a été rapportée à ce jour. Seule une **transmissibilité partielle** de la MA a été observée, dans des conditions exceptionnelles. L'inoculation iatrogène de matériels contaminés (hormone de croissance, greffes de dure-mère lyophilisée) ou l'utilisation supposée de matériel chirurgical contaminé est à l'origine de la transmission de la pathologie A β . Cette pathologie induite ne s'intègre toutefois pas dans un tableau clinico-pathologique complet de la MA malgré des temps d'incubation exceptionnellement longs : aucune pathologie Tau, ni aucune manifestation clinique évocatrice d'une MA, n'ont été rapportées. A ce jour, il n'existe que peu de données en faveur d'une transmissibilité de la pathologie Tau chez l'Homme : seuls quelques rares cas de suspicion de contamination iatrogène ont été décrits. Les composantes A β et Tau présentent donc des capacités d'ensemencement et de propagation suivant un mécanisme de type-prion qui interviennent, du moins partiellement, dans la progression des lésions de la MA mais qui ne suffisent pas à déclencher tous les aspects de la maladie. L'initiation des pathologies A β et Tau nécessite, sans doute, des conditions cellulaires favorables, probablement liées au vieillissement, qui restent à définir. De tels prérequis expliquent pourquoi la MA n'est pas transmissible dans son intégralité et présente des propriétés infectieuses limitées, à la différence des maladies à prions.

2.3.2. Définitions d'un propagon

Dans la littérature, les termes de « type-prion » ou « prionoïdes » qualifiant les mécanismes pathologiques associés à l'A β et à la Tau sont imprécis et ambigus. Pour ces pathologies, les mécanismes de conversion et de propagation de type-prion ne s'appliquent qu'aux niveaux moléculaire et tissulaire, à la différence du prion (PrP^{Sc}) dont la propagation est possible de surcroît aux niveaux systémique et inter-individuel. Ces différences nécessitent une distinction sémantique, à l'origine de la proposition du terme de « propagon » (Eisele et Duyckaerts, 2016). Ce terme doit être ici distingué de celui initialement proposé pour désigner l'unité minimale infectieuse du prion de levure [PSI⁺] (Cox et al., 2003). Nous l'appliquons à

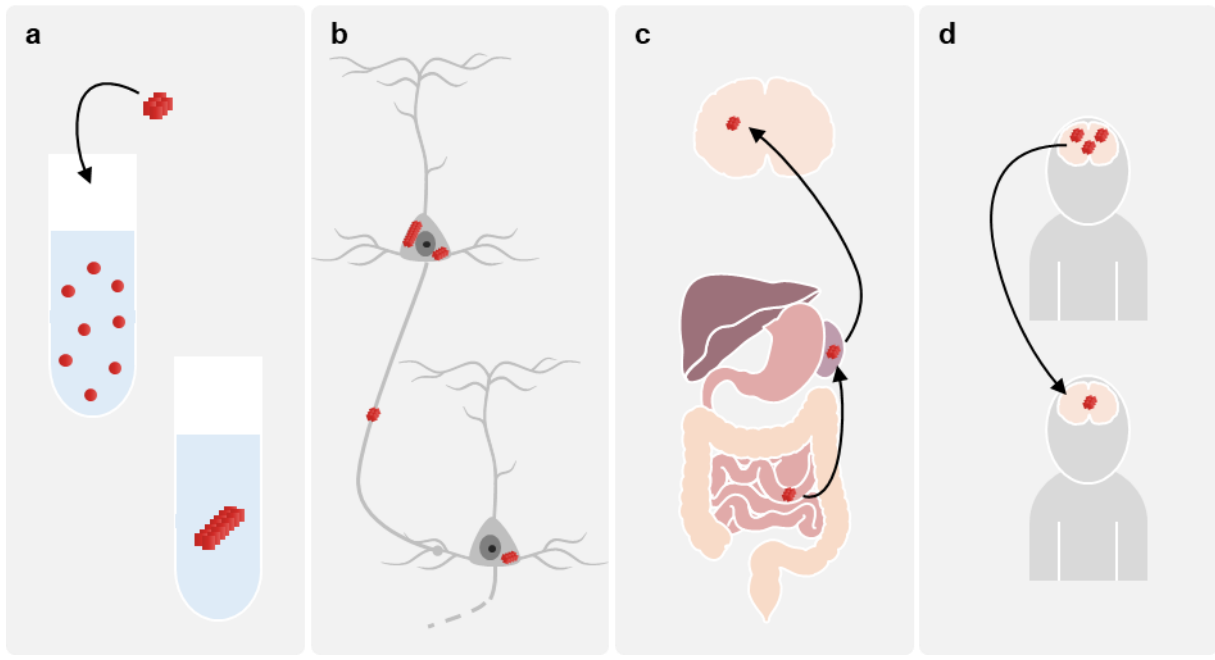


Figure 8 : Les propagons. a) Propagons moléculaires, b) tissulaires, c) systémiques et d) inter-individuels. La représentation schématique des propagons (carrés rouges) est arbitraire, le niveau d'assemblage et la conformation des entités actives sont encore inconnus et dépendent de la protéine, du contexte expérimental, de la pathologie,...
Figure 8 d'après Eisele et Duyckaerts, 2016.

toute protéine ou assemblage protéique mal conformé(e) susceptible de transmettre sa mauvaise conformation à d'autres protéines homologues et de propager la pathologie. Cette notion est identique au concept initial de protéine infectieuse proposé par Prusiner. D'ailleurs, la PrPsc est un propagon. Mais le terme de prion est aujourd'hui trop rattaché à la PrPsc pour être utilisé sans ambiguïté à propos de la MA, des tauopathies ou des synucléinopathies. Le caractère pathogène des propagons peut se déployer à différentes échelles (**Figure 8**), selon la protéine concernée (A β , Tau, α -synucléine, PrP) :

- **Echelle moléculaire** : le mauvais repliement de la protéine mal conformée est répliqué par conversion d'une protéine homologue native *in vitro*.
- **Echelle tissulaire** : des agrégats de protéines mal conformées se propagent dans un tissu donné, par fragmentation et dissémination de nouveaux propagons.
- **Echelle systémique** : les agrégats s'étendent à différents tissus. La maladie à prions peut débuter dans les tissus périphériques (*e.g.* rate, système nerveux périphérique) avant d'atteindre secondairement l'encéphale. C'est l'exemple de la transmission à l'Homme de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- **Echelle inter-individuelle** : la pathologie peut être transmise d'un organisme à l'autre. Dans le cas de la tremblante du mouton, la PrPsc n'est pas confinée à l'encéphale et

peut être excrétée par la salive ou les excréments dans l'environnement, où son activité infectieuse persiste dans le temps. L'ingestion de ces agents transmissibles induit la pathologie chez d'autres congénères, après une longue période d'incubation.

Seuls certains propagons ont la propriété de se propager aux quatre niveaux décrits. La propagation des pathologies A β et Tau, par exemple, n'est avérée qu'aux échelles moléculaire et tissulaire. Ces pathologies étant restreintes au système nerveux central, les propagons associés ne sont pas excrétés naturellement dans l'environnement et ne sont pas transmis entre individus, excepté lors de contamination iatrogène. La MA est partiellement transmissible ; elle n'est pas infectieuse.

Résumé du chapitre 2

- Le prion est une protéine infectieuse transmissible dont la pathogénicité repose sur son mauvais repliement, dû à un enrichissement en feuillets β . Ce mauvais repliement peut être transmis par conversion de protéines homologues endogènes bien repliées, initiant leur auto-agrégation stabilisatrice.
- Le peptide A β et la protéine Tau peuvent transmettre par contact leur mauvaise conformation à des protéines homologues endogènes natives et induire leur auto-agrégation, tels des prions. L'analogie n'est toutefois pas absolue : le caractère transmissible des composantes A β et Tau de la MA apparaît limité.
- Le peptide A β et la protéine Tau mal conformés constituent chacun des propagons capables d'induire et de propager leur pathologie respective aux échelles moléculaire et tissulaire. La conformation et le degré d'assemblage de ces propagons restent à identifier chez l'Homme, de même que leur(s) mode(s) de dissémination.

3. Dissémination des propagons A β et Tau

3.1. Progression de la pathologie A β

3.1.1. Topographie des lésions

Durant la MA, les dépôts d'A β parenchymateux affectent différentes régions de l'encéphale, suivant une progression stéréotypée décrite par les cinq phases de Thal (Thal et al., 2002b). La pathologie A β se développe d'abord dans l'ensemble du néocortex, de façon diffuse ; il est difficile de mettre en évidence une séquence hiérarchique au sein du néocortex (**phase 1**). La pathologie affecte ensuite l'hippocampe (**phase 2**), puis le noyau lenticulaire et le thalamus (**phase 3**), avant d'atteindre le mésencéphale (**phase 4**) et d'affecter finalement le cervelet (**phase 5**). Cette progression pourrait être le fait de propagons A β suivant des voies de transports probablement multiples.

3.1.2. Voies de transport putatives des propagons A β

3.1.2.1. Connexions neuroanatomiques

La topographie lésionnelle évoque de prime abord la possibilité d'une transmission des propagons via les connexions neuroanatomiques. En effet, la pathologie s'étend vers des régions recevant des projections de structures cérébrales atteintes en amont (Thal et al., 2002b). Une telle hypothèse de transport impliquerait une discontinuité des lésions observées.

Chez l'Homme

Les données neuropathologiques décrivent plusieurs exemples de régions sévèrement touchées, localisées à proximité immédiate de régions parfaitement préservées (Eisele et Duyckaerts, 2016). La pathologie A β observée dans le néocortex concerne principalement les couches corticales supérieures, suggérant la mise en jeu de connexions cortico-corticales. Dans le noyau lenticulaire, les dépôts d'A β affectent le putamen qui reçoit des afférences du néocortex, atteint précocement durant l'évolution de la pathologie (**Figures 9a et 9b**). En revanche, la pathologie A β épargne le pallidum pourtant localisé à proximité immédiate du putamen, avec lequel il est massivement connecté – ce qui laisse supposer qu'une vulnérabilité sélective est aussi impliquée. Dans le gyrus denté, les dépôts se forment d'abord dans la couche moléculaire externe du gyrus denté (recevant les projections issues de la couche pré- α du cortex entorhinal, via la voie perforante), avant de se développer dans la couche moléculaire profonde

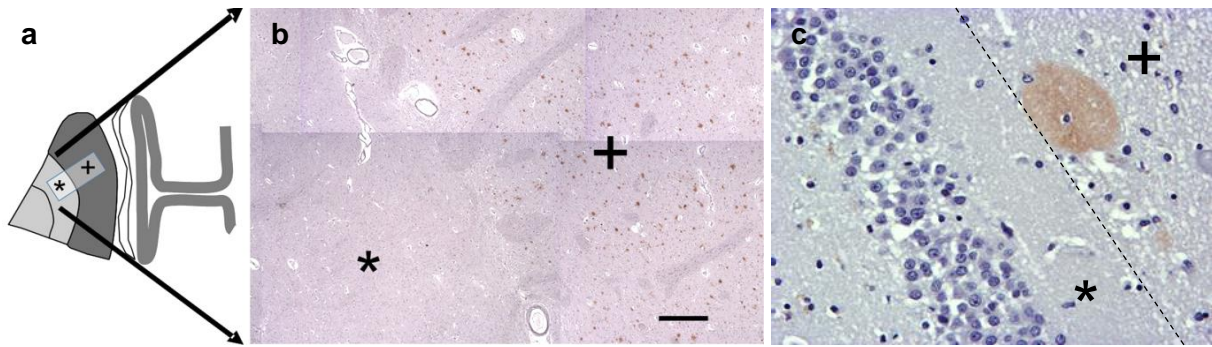


Figure 9 : Exemples de topographie lésionnelle en faveur du rôle des connexions dans la dissémination de la pathologie Aβ. a) Le schéma représente la position des champs microscopiques photographiés pour constituer l'image composite présentée en b). b) Cerveau humain. Striatum d'un cas *post-mortem*, immunomarcqué avec l'anticorps anti-Aβ 6F3D. Des dépôts diffus sont observés dans le putamen (+), mais sont absents du pallidum immédiatement adjacent (*). Barre d'échelle : 500 μm. c) Cerveau humain. Hippocampe d'un cas *post-mortem*, immunomarcqué avec l'anticorps anti-Aβ 6F3D, observé au grossissement x20. Des vacuoles sont observées dans la couche moléculaire externe du gyrus denté (*) qui reçoit les axones de la couche pré-α du cortex entorhinal où la pathologie Tau est abondante. La couche moléculaire profonde (+) est en revanche préservée. A ce stade, les dépôts d'Aβ sont confinés dans la couche moléculaire externe.

Figure 9 tirée d'Eisele et Duyckaerts, 2016.

du gyrus denté (recevant les projections issues du secteur CA4 de l'hippocampe). Une telle hiérarchie ne peut s'expliquer ni par vulnérabilité sélective, ni par diffusion passive ; elle démontre le rôle des connexions (**Figure 9c**).

Observations expérimentales

L'injection d'Aβ chez la souris tg *APP* induit la formation de dépôts d'Aβ à proximité du site d'injection, ainsi qu'au sein de régions distantes. L'injection unilatérale d'homogénats néocorticaux de cerveaux Alzheimer dans l'hippocampe de souris tg *APP* (Suédoise) induit le développement de dépôts d'Aβ dans l'hippocampe injecté, mais également dans le cortex entorhinal ipsilatéral ou l'hippocampe controlatéral (Kane et al., 2000; Walker et al., 2002). Des souris tg *APP* (Suédoise) injectées dans le cortex entorhinal développent localement une pathologie Aβ qui se propage, comme chez l'Homme dans la partie superficielle de la couche moléculaire du gyrus denté, innervée par les neurones du cortex entorhinal via la voie perforante (Eisele et al., 2009). La destruction par l'acide iboténique du subiculum de l'hippocampe de souris tg *APP* (Artique) limite en revanche la progression de la pathologie Aβ induite vers des régions anatomiquement connectées (George et al., 2014). Ces données expérimentales évoquent la possibilité d'une dissémination des propagons par les fibres axonales, de façon antérograde ou rétrograde. La pertinence physiopathologique de ces données reste à définir : on

peut aussi imaginer que l'apport massif d'A β extracellulaire induit, par gradient, la diffusion passive de l'A β le long des fibres.

3.1.2.2. Diffusion passive

La localisation extracellulaire des dépôts d'A β et leur distribution parfois homogène soulèvent la possibilité additionnelle d'une propagation par diffusion dans le milieu extracellulaire (Eisele et Duyckaerts, 2016).

Chez l'Homme

La **diffusion passive** de l'A β dans le milieu extracellulaire peut expliquer l'observation de bandes d'A β sous-piales, ainsi que de grands dépôts diffus « en lac » dans le pré-subiculum, dont la morphologie et la topographie sont incompatibles avec une implication de connexions neuroanatomiques. Les dépôts d'A β observés dans un fragment de cortex cérébral déconnecté, dans le cortex frontal d'une patiente opérée d'un méningiome frontal 27 ans avant son décès, ne peuvent qu'être indépendants de toutes connexions (Duyckaerts et al., 1997). Quant à la présence de dépôts périvasculaires, elle indique la possibilité d'une **diffusion vasculaire** de l'A β qui se propagerait des vaisseaux au parenchyme ou inversement. Ces dépôts pouvant être localisés autour d'artères et de veines, ils ne sont pas liés à une quelconque innervation vasculaire. L'observation de bandes sous-piales continues à la surface corticale suggère également la possibilité d'une **diffusion par le liquide céphalo-rachidien**. L'espace de Virchow-Robin est parfois entouré d'un halo d'A β dont la morphologie illustre la possibilité d'un flux extracellulaire issu du liquide céphalo-rachidien, ou dirigé vers ce dernier.

Observations expérimentales

L'injection intracérébrale chez la souris tg *APP* d'homogénats de cortex cérébral de cas de MA contenant de l'A β induit la formation de nombreux dépôts dans la région cérébrale injectée (Eisele et al., 2009; Hamaguchi et al., 2012; Kane et al., 2000; Meyer-Luehmann et al., 2006; Walker et al., 2002). Des neurones embryonnaires dérivés de souris de type sauvage ont été transplantés chez la jeune souris tg *APP* (Suédoise) : des dépôts d'A β se sont formés dans le greffon trois mois après l'opération (Meyer-Luehmann et al., 2003). Ces observations indiquent la capacité des propagons A β à **diffuser passivement** dans le milieu extracellulaire. Chez la souris transgénique, des inoculations intrapéritonéale (Eisele et al., 2010) ou intraveineuse (Burwinkel et al., 2018) d'A β contenus dans des homogénats de cerveaux,

humains ou murins, suffisent à induire une pathologie A β cérébrale, après une longue période d'incubation. L'apport intracérébral de propagons par **diffusion vasculaire** est donc également envisageable. En revanche, peu d'études expérimentales soutiennent la possibilité d'une diffusion via le liquide céphalo-rachidien. Le caractère inerte des peptides A β trouvés dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de MA suggère qu'il ne constitue pas une source de propagons (Fritschi et al., 2014).

3.1.2.3. Implication des cellules gliales

Les cellules microgliales et astrocytaires pourraient contribuer à la dissémination des propagons A β . La pathologie A β est associée à l'activation du système immunitaire inné qui conduit notamment à la formation, par la **microglie activée**, de granules de protéines ASC (« *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* ») constituant l'inflammasome. La libération de ces granules, capables de se fixer à l'A β et de favoriser son oligomérisation, exacerbe la dissémination de nouveaux propagons (Venegas et al., 2017). Les cellules microgliales pourraient également intervenir dans la neutralisation des propagons et limiter la propagation de la pathologie A β . L'activation des cellules microgliales réduit le développement de la pathologie A β induite chez la souris tg 5xFAD inoculée en intracérébral par des homogénats de cerveaux de souris tg 5xFAD âgées (Ziegler-Waldkirch et al., 2018). De plus, la déplétion conditionnelle de la microglie chez la souris tg *APP/PS1* (Suédoise/dE9) conduit à l'augmentation du volume des dépôts d'A β parenchymateux (Zhao et al., 2017). La présence d'A β dans le cytoplasme d'astrocytes a laissé supposer qu'ils contribuaient à sa clairance (Akiyama et al., 1999; Yamaguchi et al., 1998), mais le rôle des **astrocytes** dans la physiopathologie de la MA reste mal connu.

3.2. Progression de la pathologie Tau

3.2.1. Topographie des lésions

Au cours de la MA, les DNF et les fibres tortueuses se forment dans diverses régions de l'encéphale, suivant un ordre stéréotypé. La progression de la pathologie neurofibrillaire permet de reconnaître six stades selon Braak et Braak (Braak et Braak, 1991). Elle débute par l'atteinte de la couche de neurones pré- α du cortex trans-entorhinal (**stades I/II**). Sont ensuite affectés les neurones pré- α du cortex entorhinal. En outre, des DNF apparaissent dans l'hippocampe (**stades III/IV**). S'ensuit une atteinte de l'isocortex (**stades V/VI**), les aires associatives multimodales étant les premières touchées, suivies par les aires associatives unimodales, puis

les aires sensorielles primaires (Arnold et al., 1991; Duyckaerts et al., 1998; De Lacoste et White, 1993). Cette progression séquentielle, constamment observée durant de la MA, suggère une dispersion de propagons Tau, dont les voies de transport mises en jeu restent à éclaircir.

3.2.2. Voies de transport putatives des propagons Tau

3.2.2.1. Connexions neuroanatomiques

Le caractère intraneuronale des agrégats de Tau et la topographie lésionnelle de la pathologie neurofibrillaire évoquent un transport de propagons Tau à travers les circuits neuronaux, davantage que par diffusion passive (Braak et Braak, 1991). Un tel mode de dissémination implique l'atteinte sélective de régions connectées.

Chez l'Homme

La progression de la pathologie neurofibrillaire affecte des régions discontinues et interconnectées. Seuls les noyaux sous-corticaux directement connectés au cortex cérébral (sans relai thalamique), tels que les noyaux du raphé, le noyau basal de Meynert ou la *substantia nigra*, développent des DNF (German et al., 1987). Dans l'isocortex, les connexions cortico-corticales semblent impliquées dans la progression des lésions Tau (Duyckaerts et al., 1998). L'étude du système entorhino-denté révèle une atteinte en deux temps du champ dendritique du gyrus denté par la pathologie Tau : des fibres tortueuses enrichies en Tau-p sont d'abord observées dans la partie superficielle de la couche moléculaire du gyrus denté – recevant les projections du cortex entorhinal, atteint précocement par la pathologie neurofibrillaire (**Figure 10**). L'atteinte de la partie profonde de la couche moléculaire est plus tardive et correspond à l'apparition des DNF dans les neurones du hile du gyrus denté (CA4) : ce sont les neurones qui sont à l'origine des axones qui rejoignent cette partie profonde (Eisele et Duyckaerts, 2016). L'étude de la patiente chez qui l'exérèse d'un méningiome frontal avait provoqué la désafférentation d'un fragment de cortex a révélé l'absence de pathologie neurofibrillaire dans cette portion isolée de cortex frontal (Duyckaerts et al., 1997). Ces données sont compatibles avec l'hypothèse d'un transport de propagons Tau de neurones en neurones, suivant les connexions neuroanatomiques. La dispersion de ces propagons serait précoce ; elle précède l'apparition des lésions neuropathologiques (Furman et al., 2017).

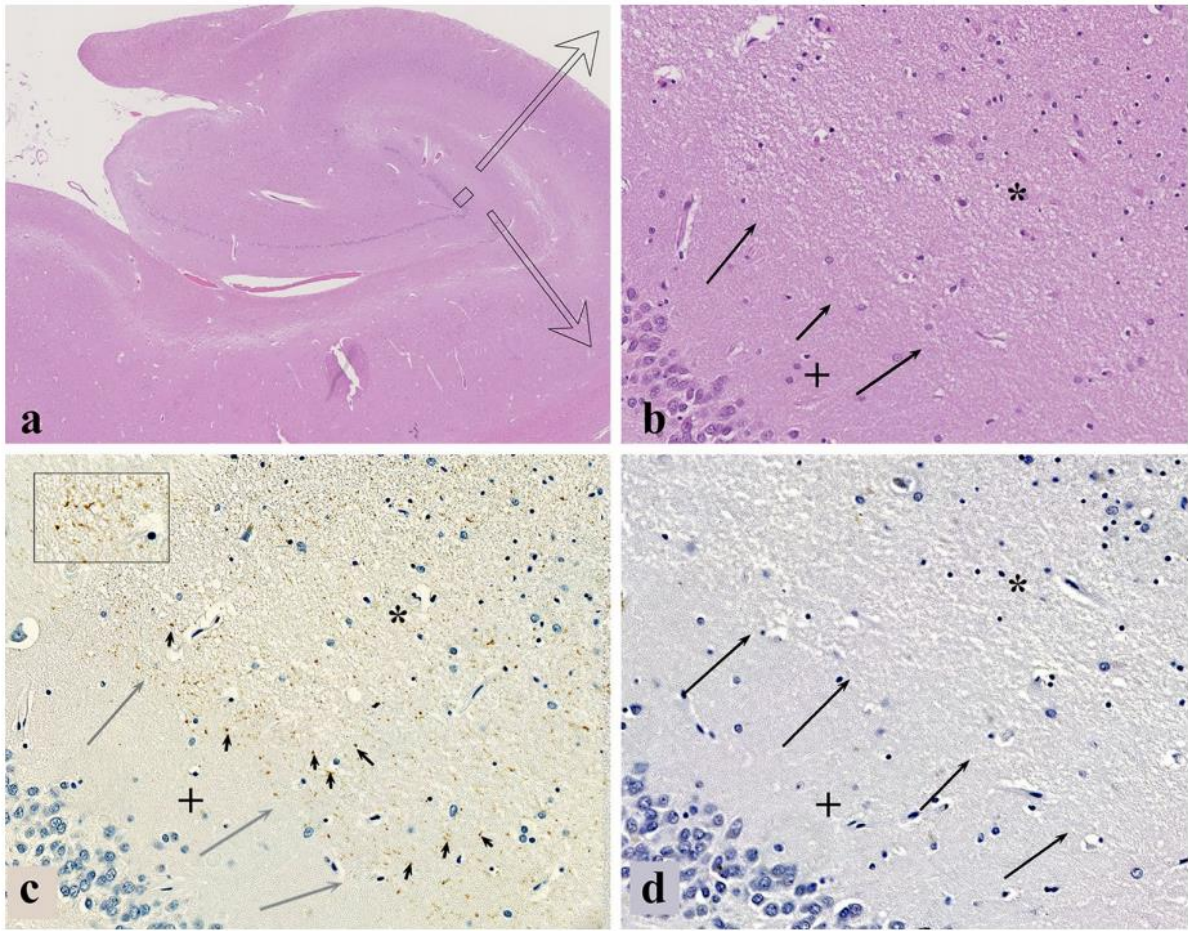


Figure 10 : Exemple de topographie lésionnelle en faveur du rôle des connexions dans la dissémination de la pathologie Tau. Cerveau humain. Hippocampe d'un cas *post-mortem*, coloré par l'hématoxyline-éosine (a, b) et immunomarcqué avec l'anticorps anti-Tau-p AT8 (c) et anti-A β 6F3D (d). La même région est observée à faible grossissement ($\times 1.25$) en a) et à $\times 20$ en b), c), et d). a) Le rectangle est situé dans la couche moléculaire du gyrus denté et correspond au champs microscopique représenté en b), c), et d). b) Des vacuoles sont observées dans la couche moléculaire externe (*) qui reçoit les axones de la couche pré- α du cortex entorhinal où la pathologie Tau est abondante. La couche moléculaire interne (+) est en revanche préservée. c) Des accumulations de Tau-p AT8 positives d'aspect neuritique ou ponctiforme sont présentes et sont restreintes à la couche moléculaire externe du gyrus denté (flèches) – aire de projection des neurones pré- α du cortex entorhinal affectés par la pathologie Tau. Insert : observation à plus fort grossissement des accumulations de Tau-p neuritiques et ponctiformes, probablement axonales en raison de la finesse des neurites et de l'absence d'épine dendritique. d) Aucune accumulation d'A β n'est observée à ce stade alors que la pathologie Tau est déjà présente.

Figure 10 tirée d'Eisele et Duyckaerts, 2016.

Observations expérimentales

L'injection stéréotaxique d'homogénats de cerveaux provenant de souris tg *MAPT* P301S dans l'hippocampe de souris tg *MAPT* induit l'agrégation de protéines Tau endogènes dans les neurones localisés aux abords du site d'injection. Ce résultat suggère une diffusion

locale des propagons inoculés ou un transport de propagons inter-neuronal de proche en proche. Au fil du temps, la pathologie progresse vers des régions distantes mais anatomiquement connectées, telles l'hippocampe controlatéral ou le corps mamillaire (Clavaguera et al., 2009). Des conclusions similaires ont été tirées d'expériences analogues réalisées ensuite (Ahmed et al., 2014; Boluda et al., 2015; Iba et al., 2015; Peeraer et al., 2015; Stancu et al., 2015). Dans un modèle de souris tg *MAPT* (P301L), l'expression du transgène codant la Tau P301L est sous le contrôle d'un promoteur spécifique des neurones de la couche II du cortex entorhinal. La pathologie Tau débute dans ces neurones du cortex entorhinal exprimant le transgène puis intéresse des neurones qui ne l'expriment pas, d'abord dans les autres couches neuronales du cortex entorhinal, puis à distance dans des régions connectées (entre autres, le gyrus denté, la corne d'Ammon et le cortex cingulaire). La dispersion de la protéine Tau mutée P301L dans ces régions distantes initie l'agrégation de protéines Tau murines endogènes, non mutées. La propagation de la pathologie Tau implique, dans ce modèle, un transport trans-synaptique d'abord de protéines Tau P301L pro-agrégatives puis de protéines Tau sauvages mal conformées (de Calignon et al., 2012; Liu et al., 2012). *In vivo*, la stimulation optogénétique ou chromogénétique de l'activité neuronale exacerbe la pathologie Tau (Wu et al., 2016). Les mécanismes de transport trans-synaptiques sont mal connus. La libération de propagons Tau dans la fente synaptique pourrait être liée à une exocytose ou à une dégradation membranaire. L'internalisation post-synaptique pourrait être le fait d'une fusion exosomale, d'une endocytose nécessitant un récepteur spécifique, d'une macropinocytose, d'une phagocytose ou d'une interaction avec des protéoglycanes à héparanes sulphates (Vaquer-Alicea et Diamond, 2019). Le transfert inter-neuronal d'agrégats de protéines Tau pourrait également faire intervenir la constitution de tunnels intercellulaires par des nanotubes (Tardivel et al., 2016). La réalité et l'importance de ces mécanismes de transport inter-neuronal restent à déterminer. La plupart d'entre eux aboutissent théoriquement à la transmission de propagons Tau confinés dans des vésicules subcellulaires et n'expliquent pas leur présence dans le cytosol. Les mécanismes décrits sont de plus conditionnés par les paramètres expérimentaux, tels que le type cellulaire ou la conformation et la taille des propagons utilisés.

3.2.2.2. Implication des cellules gliales

Les cellules gliales n'occupent pas un rôle central dans la dissémination des propagons Tau telle qu'elle vient d'être décrite. Des données expérimentales témoignent cependant de leur importance. L'activation de la **microglie** est positivement corrélée à la propagation de la pathologie Tau chez la souris tg *MAPT*. Ces cellules microgliales activées, purifiées et

transférées dans le cerveau de souris non-transgéniques, induisent l'hyperphosphorylation de Tau (Maphis et al., 2015). La déplétion microgliale, d'autre part, inhibe la propagation de la pathologie Tau *in vivo* (Asai et al., 2015). Le rôle de la microglie pourrait passer par l'inflammasome. En effet, l'internalisation de Tau-p agrégées par les cellules microgliales active la voie NLRP3-ASC de l'inflammasome qui exacerbe la pathologie Tau, qu'elle soit endogène – relevant d'une mutation – ou transmise par induction exogène (Stancu et al., 2019). Bien que les **oligodendrocytes** et les **astrocytes** ne soient pas affectés par la pathologie Tau associée à la MA, des inclusions oligodendrogiales ou astrocytaires peuvent être observées dans diverses tauopathies primaires, ainsi que chez le sujet âgé. Les oligodendrocytes peuvent former des corps spiralés (« *coiled bodies* ») Tau-p positifs dans la plupart d'entre elles. Les inclusions de Tau-p astrocytaires constituent des touffes astrocytaires dans la paralysie supranucléaire progressive ou des plaques astrocytaires dans la dégénérescence cortico-basale (Komori et al., 1998). Des astrocytes enrichis en Tau-p sont également observés chez le sujet âgé, autour des vaisseaux ou à proximité des cavités ventriculaires. Ces altérations ont été qualifiées d'astrogliopathie Tau liée à l'âge (ARTAG, pour « *aging-related Tau astrogliopathy* » ; Kovacs et al., 2016a).

3.3. Relations entre les progressions des pathologies Tau et A β

3.3.1. Les pathologies A β et Tau ne sont pas indépendantes

Les pathologies A β et Tau semblent progresser en **synergie** au cours de la MA. Ces pathologies sont indissociables aux stades avancés de la maladie, les configurations de type « Braak 0, Thal 5 » ou « Braak VI, Thal 0 » n'étant pas observées. Les lésions A β et Tau progressent de régions en régions suivant des ordres distincts, mais aboutissent à des topographies en grande partie superposables. Les deux pathologies se rejoignent d'ailleurs localement au sein de la plaque sénile. Les relations entre les pathologies A β et Tau demeurent toutefois obscures. L'analyse croisée de ces composantes individuellement complexes est délicate, d'autant qu'il n'existe pas de modèle expérimental pertinent capable de récapituler les pathologies A β et Tau de la MA.

3.3.2. La pathologie A β influence-t-elle la progression de la pathologie Tau ?

Chez l'Homme

Les mutations impliquées dans le développement de maladies d'Alzheimer familiales concernent uniquement les gènes associés au métabolisme de l'A β . Ce constat est à l'origine de l'hypothèse de la cascade amyloïde selon laquelle la pathologie Tau serait causée par la pathologie A β (Hardy et Higgins, 1992). Les données épidémiologiques obtenues à partir d'une cohorte de 2,661 cas *post-mortem* d'âges variés indiquent cependant qu'une prévalence de 0,5 est atteinte à 47,4 ans pour la pathologie Tau (au moins une DNF dans le cortex entorhinal), contre 73,9 ans pour la pathologie A β (au moins un dépôt dans le néocortex ; Braak et Braak, 1997; Duyckaerts et Hauw, 1997). Les cas comportant des lésions Tau confinées au cortex entorhinal et à l'hippocampe, sans accumulation d'A β , ont été distingués d'une MA et isolés sous la dénomination de PART (pour « *primary age related tauopathy* » ; Crary et al., 2014), un concept toutefois controversé : PART étant une étape nécessaire au développement de la MA, des cas étiquetés PART évolueront nécessairement vers une MA (Duyckaerts et al., 2015). D'autre part, les cas de transmission iatrogène de pathologie A β récemment décrits présentent de nombreux dépôts d'A β parenchymateux et vasculaires, non associés au développement de lésions Tau. Ces données contredisent donc l'hypothèse selon laquelle la pathologie A β cause la pathologie Tau. En revanche, l'apparition de la pathologie A β semble amplifier l'intensité et la progression de la pathologie Tau chez l'Homme. L'A β n'apparaît donc pas impliqué dans l'*initiation* de la pathologie Tau, mais semble *promouvoir* sa progression.

Observations expérimentales

In vitro, des oligomères d'A β peuvent induire le mauvais repliement de protéines Tau et provoquer leur fibrillisation (Rudenko et al., 2019; Vasconcelos et al., 2016). Les protéines Tau fibrillisées au contact de l'A β sont capables d'initier et de propager la pathologie Tau *in vivo* (Vasconcelos et al., 2016). Le traitement de neurones par des oligomères d'A β stimule *in vitro* l'internalisation cellulaire d'espèces moléculaires de Tau pathogéniques (Shin et al., 2019). Cependant, les modèles de souris transgéniques obtenus à partir de mutations responsables de maladies d'Alzheimer familiales développent une pathologie A β sans qu'une pathologie Tau comparable à celle observée chez l'Homme ne soit induite. Seule une accumulation neuritique de Tau-p peut être observée dans la couronne des plaques séniles (<https://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>). La pathologie A β n'est donc

pas capable d'induire une pathologie Tau, et ce même lorsque la souris exprime l'APP et la Tau humaines. La présence d'A β amplifie et accélère toutefois la propagation de lésions Tau préexistantes ou induites expérimentalement (Götz et al., 2001; Héraud et al., 2014; Pooler et al., 2015; Vergara et al., 2019).

3.3.3. La pathologie Tau influence-t-elle la progression de la pathologie A β ?

Chez l'Homme

La pathologie Tau précède l'accumulation A β à l'échelle épidémiologique et semble la guider localement, dans différents systèmes de connexions caractérisés (Braak et Del Tredici, 2013; Duyckaerts et Hauw, 1997). Le *locus caeruleus* (Braak et al., 2011) et les noyaux du raphé (Grinberg et al., 2009) sont affectés précocement par la pathologie Tau et projettent dans le néocortex, où les axones Tau-p positifs pourraient être associés à la formation des premiers dépôts d'A β . Dans le noyau lenticulaire, les dépôts d'A β ne se forment dans le putamen que lorsque le néocortex qui l'innerve est affecté par la pathologie neurofibrillaire, aux stades de Braak V ou VI. Dans le système entorhino-denté, la formation de dépôts d'A β dans la couche moléculaire du gyrus denté suit l'apparition en deux temps des terminaisons axonales Tau-p positives, d'abord dans la couche moléculaire externe du gyrus denté puis dans la couche moléculaire interne (Eisele et Duyckaerts, 2016 ; cf. sections 3.1.2.1 et 3.2.2.1). Ces observations neuropathologiques n'excluent pas la possibilité que l'A β soluble, non détectable en immunohistochimie, puisse initier, de façon rétrograde, l'agrégation de Tau. L'absence de pathologie A β dans les autres tauopathies primaires, couplée à l'absence de mutation *MAPT* causale dans la MA familiale, rend l'hypothèse d'une induction de la pathologie A β par la pathologie Tau peu probable. Ces données suggèrent néanmoins un lien entre la pathologie Tau et l'accumulation d'A β au niveau des terminaisons axonales. Une telle relation à distance pourrait justifier les discordances topographiques apparentes de ces pathologies.

Observations expérimentales

En dépit des données neuropathologiques que nous venons de considérer, il n'existe que peu de résultats expérimentaux en faveur d'une influence de la pathologie Tau sur l'accumulation d'A β . Les fragments N-ter de Tau sécrétés par des neurones primaires corticaux humains stimulent la sécrétion d'A β *in vitro* (Bright et al., 2015). Cependant, peu de modèles *in vivo* soutiennent un effet de la pathologie Tau sur la pathologie A β , bien que des biais expérimentaux puissent affecter ces résultats. Un grand nombre de modèles hybrides – Tau et

A β – ont en effet recours aux mutations *MAPT* associées à des tauopathies primaires autres que la MA, alors que ces tauopathies présentent une pathologie Tau et des propagons associés aux caractéristiques distinctes de ce qui est observé dans la MA (*cf. Annexe 2 : Tauopathies*). D'autre part, la délétion de Tau réduit le développement de plaques séniles et améliore les déficits comportementaux chez la souris tg *APP/PS1*. Les effets toxiques de la pathologie A β nécessitent la présence de protéines Tau (Peters et al., 2019; Pickett et al., 2019).

Résumé du chapitre 3

- La diffusion extracellulaire passive constituerait une voie de dissémination majeure des propagons A β , bien que la topographie de la pathologie A β semble également influencée par les connexions neuroanatomiques, selon des mécanismes méconnus. Les connexions neuroanatomiques joueraient un rôle essentiel dans le transport des propagons Tau.
- Chez la souris double transgénique, la pathologie A β favorise la propagation de la pathologie Tau, tandis que la pathologie Tau n'a pas ou seulement peu d'effet sur la pathologie A β . La pathologie A β et les effets toxiques qui lui sont associés sont cependant atténués par la déplétion de Tau.
- Les pathologies A β et Tau progressent en synergie et semblent s'influencer au niveau des terminaisons axonales. Le rôle des connexions neuronales dans la progression et les relations des pathologies A β et Tau doit être mieux défini, chez l'Homme.

Problématiques et objectifs

1. Problématiques

La biologie moléculaire et la génétique ont apporté dans les années 1990 une nouvelle conception de la MA. L'identification des protéines impliquées, Tau et A β , et des mutations en cause dans les formes familiales ont abouti à l'hypothèse de la cascade amyloïde. Les dernières décennies ont apporté une nouvelle donnée : le rôle des protéines mal conformées. Mais beaucoup reste à faire dans ce domaine. Quelles espèces moléculaires constituent les propagons d'A β et de Tau, responsables de la propagation des lésions de la MA, du moins dans les modèles animaux ? Sont-ils incriminés dans la propagation des lésions chez l'Homme, comme le laisse penser la transmission de la pathologie amyloïde ? Et si tel est le cas, comment les propagons sont-ils transportés d'une région à l'autre de l'encéphale ? Quelles relations topographiques et hiérarchiques lient les pathologies A β et Tau ? En l'absence de modèle expérimental récapitulant simultanément les pathologies A β et Tau humaines, ces aspects doivent être explorés directement dans l'encéphale de patients Alzheimer. Pour s'affranchir de la possibilité d'une dissémination des propagons par simple diffusion de proche en proche, il est nécessaire de choisir des régions cérébrales atteintes de façon séquentielle, mais séparées par une distance aussi longue que possible. Il faut idéalement que les compartiments somato-dendritique, axonal et synaptique soient topographiquement distincts. Le système subiculo-fornico-mamillaire répond à ces exigences.

2. Le système subiculo-fornico-mamillaire

2.1. Anatomie

Le système subiculo-fornico-mamillaire est un élément clé du circuit de Papez, ce dernier associant l'hippocampe, le corps mamillaire, le noyau thalamique antérieur et le gyrus cingulaire (Bubb et al., 2017; Papez, 1937). Le circuit subiculo-fornico-mamillaire débute en effet dans le subiculum de l'hippocampe, localisé entre le champ CA1 de la corne d'Ammon et le pré-subiculum. La frontière entre CA1 et le subiculum est marquée par une augmentation du nombre de couches de neurones pyramidaux, tandis que le pré-subiculum se distingue du subiculum par la présence d'îlots de petites cellules pyramidales dans la couche II (couche parvopyramidale ; Braak, 1978). Les efférences des neurones pyramidaux du subiculum se rejoignent dans un faisceau isolé d'axones myélinisés : le pilier du fornix. Localisé sous le corps calleux, le fornix est une commissure interhémisphérique limitée latéralement par les piliers du fornix, deux larges faisceaux associatifs intrahémisphériques arqués d'environ 4,5 cm de long

et 0,75 cm de diamètre, qui comportent en moyenne 2 millions de fibres chacun (Daitz, 1953). Le pilier du fornix se divise au niveau de la commissure antérieure. La majorité des fibres constitue la partie post-commissurale du pilier du fornix qui poursuit son trajet vers l'hypothalamus, où elle projette dans le corps mamillaire. La partie pré-commissurale du pilier du fornix, minoritaire, est quant à elle associée aux noyaux du septum et au striatum ventral (Nolte, 2008; Vann et Aggleton, 2004). Le corps mamillaire comporte deux noyaux principaux (médial et latéral). Le subiculum se projette sur le premier, lui-même connecté au noyau antérieur du thalamus qui constitue l'un des derniers maillons du circuit de Papez. Le second reçoit des afférences du pré-subiculum (Huang et al., 2017) et est connecté avec le noyau dorsal de la calotte (« *dorsal tegmental nucleus* » ; Hayakawa et Zyo, 1990). Il est impliqué dans l'orientation de la tête (Dillingham et Vann, 2019) et n'a pas été étudié ici. L'abondance des connexions subiculo-fornico-mamillaires est illustrée par l'atrophie du pilier du fornix et du corps mamillaire observée après une perte neuronale dans le subiculum de l'hippocampe, provoquée par exemple par un infarctus dans le territoire de l'artère cérébrale postérieure (Figure 11).

2.2. Fonctions

Le circuit de Papez était initialement considéré comme la base anatomique du « mécanisme » de l'émotion d'après le titre de l'article princeps (« Proposition d'un mécanisme

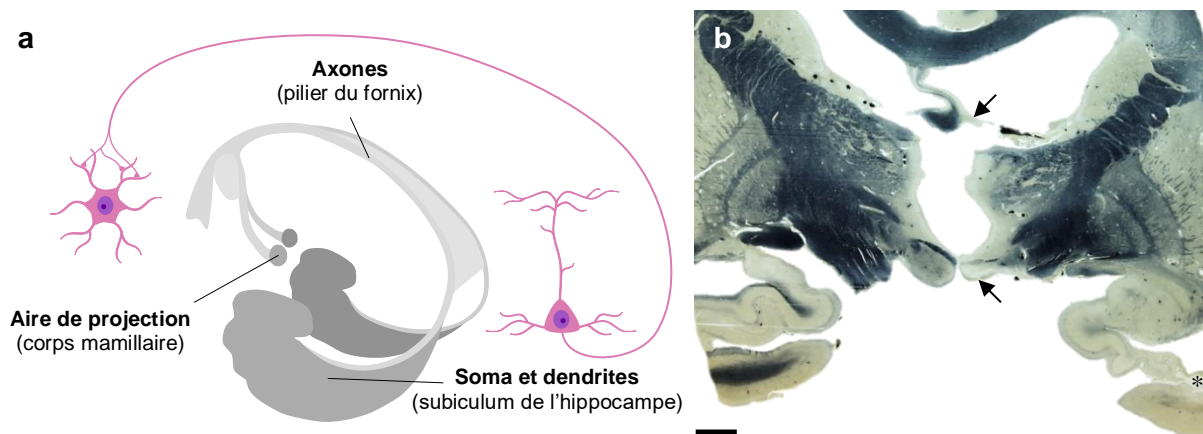


Figure 11 : Le système subiculo-fornico-mamillaire. a) Anatomie du circuit subiculo-fornico-mamillaire. b) Atrophie unilatérale du pilier du fornix (flèche supérieure) et du corps mamillaire ipsilatéral (flèche inférieure) causée par un infarctus dans le subiculum de l'hippocampe droit (*), démontrant l'abondance des connexions subiculo-mamillaires à travers le pilier du fornix. Cas illustratif issu de la collection du laboratoire de neuropathologie Raymond Escourolle, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Coupe coronale. Mise en évidence de la myéline par la méthode de Loyez. Barre d'échelle : 5 mm.

Figure 11 tirée de Thierry et al., 2019.

de l'émotion » ; Papez, 1937). Papez s'était appuyé sur les signes cliniques de patients atteints de la rage : la destruction de l'hippocampe au cours de cette affection expliquait les déficits cliniques qui, selon lui, concernaient principalement l'émotion. Cette attribution fonctionnelle a changé dans les décennies qui ont suivi du fait de constatations neuropathologiques anciennes (le syndrome de Korsakoff) et d'autres alors plus récentes (la chirurgie de l'hippocampe). Le syndrome de Korsakoff (Korsakoff, 1889) est caractérisé par une amnésie antérograde accompagnée de fausses reconnaissances et est associé à des lésions des corps mamillaires (Delay et Brion, 1969 ; Gamper, 1928 ; Gudden, 1896). D'autre part, l'ablation chirurgicale bilatérale de l'hippocampe (pour traiter une épilepsie rebelle) chez le célèbre patient HM produisit un syndrome amnésique antérograde massif (Scoville et Milner, 1957). Ces constatations ont conduit à considérer que le circuit de Papez était impliqué non pas dans le contrôle des émotions mais dans la mémoire, une thèse formalisée par Delay et Brion (Delay et Brion, 1969). Le système subiculo-fornico-mamillaire serait en particulier impliqué dans les processus d'encodage de la mémoire épisodique, bien que les données expérimentales et cliniques s'avèrent contradictoires (Aggleton et Brown, 1999). Des études de cas cliniques isolés suggèrent que l'altération du pilier du fornix induit une sévère amnésie antérograde (Aggleton, 2000; Calabrese et al., 1995; McMackin et al., 1995; Sweet et al., 1959). Cependant, d'autres données expérimentales et cliniques nuancent ces conclusions. L'altération du fornix chez le singe n'induit pas de déficits mnésiques majeurs (Bachevalier et al., 1985; Gaffan et al., 1984). La destruction massive et bilatérale du fornix par un adénocarcinome malin a été observée *post-mortem* dans le cerveau d'un cas pourtant cognitivement normal (Woolsey et Nelson, 1975). Par ailleurs, le traitement de 142 patients épileptiques par une fornicotomie bilatérale n'engendre pas de troubles mnésiques majeurs ou persistants (Garcia-Bengochea et Friedman, 1987).

2.3. Atteinte au cours de la maladie d'Alzheimer

Le pilier du fornix s'atrophie au cours de la MA (Copenhaver et al., 2006). La majorité de ses axones provient des neurones du subiculum, où des DNF apparaissent dès le stade de Braak III et où des dépôts d'A β se forment à partir de la phase 2 de Thal. Ces axones projettent vers le corps mamillaire, où les DNF se forment dès le stade de Braak IV tandis que l'A β s'accumule à partir de la phase 3 de Thal (Braak et Braak, 1991; Thal et al., 2002b). Le système subiculo-fornico-mamillaire est vascularisé par différentes artères : le subiculum est irrigué par l'artère cérébrale postérieure, tandis que l'artère communicante antérieure irrigue le corps

mamillaire (Hauw et al., 2019). La diffusion des lésions à travers le système vasculaire est donc peu plausible. Les deux structures sont, en outre, très éloignées, rendant la diffusion passive des lésions du subiculum au corps mamillaire également peu probable. Par ailleurs, le pilier du fornix présente l'avantage de n'être constitué que d'axones qui peuvent être étudiés isolément, tandis qu'ils sont difficiles à identifier dans le neuropile où ils se mélangent aux dendrites. Le système subiculo-fornico-mamillaire s'avère ainsi optimal pour l'analyse de la propagation des lésions A β et Tau à travers des connexions axonales.

3. Objectifs

Nous avons étudié le système subiculo-fornico-mamillaire chez l'Homme, afin de suivre la progression des pathologies A β et Tau à travers les axones du pilier du fornix. Les objectifs de ce travail s'articulent en quatre parties :

1. Distribution des pathologies A β et Tau dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire.

Afin de tester l'hypothèse d'une progression axonale des pathologies A β et Tau, la distribution des accumulations d'A β et de Tau-p dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire a été examinée. Des immunohistochimies anti-A β et anti-Tau-p ont été réalisées sur des prélèvements *post-mortem* de subiculum, piliers du fornix et corps mamillaires issus de 47 cas de stades de Braak et de phases de Thal variés.

2. Caractérisation de la pathologie Tau axonale du pilier du fornix.

En second lieu, l'hypothèse d'un transport axonal de propagons, capables d'induire l'agrégation de protéines autologues, a été approfondie. Seules des accumulations de Tau ont été observées dans les axones du pilier du fornix. La capacité d'homogénats de piliers du fornix à induire la pathologie Tau a donc été déterminée *in vitro*, au moyen de biosenseurs cellulaires HEK Tau RD P301S. Les espèces moléculaires de Tau détectées dans le pilier du fornix ont été caractérisées par des marquages histologiques et par microscopie électronique.

3. Relations hiérarchiques et topographiques des pathologies A β et Tau.

Les relations hiérarchiques des accumulations d'A β et de Tau, détectées par immunohistochimie, ont été explorées en retraçant leur chronologie dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire des 47 cas de stades de Braak et de phases de Thal variés. Les relations topographiques entre les axones enrichis en Tau-p et les dépôts d'A β ont été observées dans le corps mamillaire au moyen de deux approches histologiques distinctes : une technique de

transparisation permettant d'obtenir un aperçu tridimensionnel (CLARITY) et une technique de dissociation des constituants histologiques élaborée au laboratoire (la microcryodissection, Thierry et al., 2017).

4. Hypothèse physiopathologique associée à la dégénérescence axonale.

Un scénario associant la pathologie Tau axonale à l'accumulation d'A β a finalement été exploré, en étudiant la dégénérescence axonale du pilier du fornix. Des double-marquages dirigés contre les protéines basiques de la myéline (MBP) et les neurofilaments ont été effectués dans le pilier du fornix afin d'analyser la morphologie des axones. L'accumulation de l'APP, précurseur du peptide A β , a également été étudiée dans les terminaisons fornico-mamillaires, les accumulations axonales d'APP et d'A β ayant été décrites chez l'Homme dans un contexte de dommage axonal d'étiologie traumatique (Johnson et al., 2010).

Matériels et méthodes

Cohorte

Quarante-sept cas *post-mortem* ont été analysés dans cette étude. Tous les cerveaux ont été prélevés et collectés à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Paris), puis conservés dans une solution de formol à 4% de formaldéhyde. La procédure de diagnostic neuropathologique incluait l'immunohistochimie dirigée contre l'A β (6F3D, Dako), la Tau-p (AT8, Thermo-Fisher), l' α -synucléine (5G4, Sigma-Aldrich) et la TDP-43 (Proteintech Group). Les cas diagnostiqués avec des tauopathies primaires (paralysie supranucléaire progressive, dégénérescence corticobasale, mutation MAPT, maladie des grains argyrophiles, maladie de Pick) ont été exclus de l'étude. L'hippocampe, le pilier du fornix et le corps mamillaire ont été analysés pour chaque cas. Parmi les 47 cas étudiés, 38 cerveaux ont été collectés dans le cadre d'un projet de don de cerveau et stockés dans la biobanque nationale de cerveaux Neuro-CEB (Bioresource Research Impact Factor number = BRIF BB-0033-00011). La cohorte était composée de 15 femmes et 32 hommes, âgés de 51 à 96 ans (**Tableau 1**). Les cas incluaient 28 patients sans lésions assimilées à la MA ou asymptomatiques, décédés d'autres causes (Braak 0-IV) et 19 patients avec une MA avérée (Braak V-VI). Parmi les 28 patients asymptomatiques, 17 présentaient quelques lésions Tau associées à peu ou pas d'accumulation d'A β (Thal phase 1 ou 2). Les cas présentant une pathologie Tau dans l'aire entorhinale et l'hippocampe sans accumulation d'A β associée dans l'encéphale sont fréquents (Duyckaerts et Hauw, 1997 ; d'après Braak et Braak, 1997). Ces cas ont été récemment isolés sous la dénomination de PART (Crary et al., 2014), un concept discuté (Duyckaerts et al., 2015). Les huit cas de stades de Braak 0/I/II correspondaient à des cerveaux témoins dépourvus de lésion hippocampique. La pathologie Tau débutait dans le subiculum des 20 cas de stades de Braak III/IV. Les 19 cas de stades de Braak V/VI présentaient une pathologie Tau sévère dans le subiculum et dans le néocortex. Les phases de Thal variaient de 0 à 5. Quatorze cas présentaient des corps de Lewy (**Tableau 1**). Six cas additionnels ont été utilisés pour les techniques de CLARITY, microcryodissection, microscopie électronique ainsi que pour les tests d'ensemencement *in vitro* (**Tableau 1**). Le projet a été soumis au « comité de protection des personnes » Ile de France VI qui ne s'est pas opposé à l'étude (session du 20 avril 2016).

Analyse histologique

L'hippocampe, le pilier du fornix et le corps mamillaire ont été prélevés après un minimum de deux mois de fixation dans une solution de formol à 4% de formaldéhyde. Les échantillons ont été inclus en paraffine. Le pilier du fornix a été disséqué et inclus

Tableau 1 : Cas

Analyse neuropathologique (n = 47)

Cas	Braak (Tau)	Thal	Braak (α -Synuclein)	Age	Sexe	Diagnostic
01	0	0	0	51	M	Athérome coronaire et pneumopathie fongique.
02	0	1	0	66	M	Leucémie myéloblastique aiguë.
03	I	0	0	65	M	Don du cerveau. Quelques neurones ischémiques.
04	I	1	0	74	F	Lésions ischémiques.
05	II	3	0	83	M	Lymphome à grandes cellules T.
06	II	0	0	62	M	Cardiopathie ischémique, infarctus dans l'hémisphère controlatéral.
07	II	1	0	81	M	Don du cerveau. Contrôle.
08	II	1	5	67	M	Maladie de Parkinson. Corps de Lewy corticaux.
09	III	2	0	85	M	Angiosarcome périrénal avec métastases pulmonaires.
10	III	4	0	73	F	Péritonite et bronchopneumopathie aiguë.
11	III	0	0	75	M	Arrêt cardio-respiratoire après parotidectomie. Quelques dilatations de l'espace périsvasculaire dans les noyaux gris centraux.
12	III	4	5	84	M	Maladie à corps de Lewy diffus. Haute probabilité*.
13	III	0	0	71	M	Péritonite.
14	III	0	0	54	F	Cirrhose et infarctus pulmonaire.
15	III	0	0	92	F	Don du cerveau. Contrôle.
16	III	0	5	60	F	Maladie de Parkinson. Corps de Lewy corticaux.
17	III	3	6	84	M	Maladie à corps de Lewy diffus. Haute probabilité*.
18	III	0	0	66	M	Cirrhose.
19	III	0	0	70	F	Don du cerveau. Modifications neuropathologiques minimales. AAC de type 2 (méninges).
20	III	0	0	53	M	Mort subite.
21	IV	2	0	86	M	Don de cerveau. Infarctus du myocarde. AAC de type 1.
22	IV	3	0	85	F	Lacune du pont. Sclérohyalinose.
23	IV	3	0	71	M	Pancréatite aiguë et cirrhose.
24	IV	4	0	74	M	Ménocarcinome métastatique.
25	IV	1	6	85	M	Maladie de Parkinson. Corps de Lewy corticaux.
26	IV	3	6	81	M	Maladie de Parkinson. Corps de Lewy corticaux, maladie des grains argyrophiles, lacune du pallidum, vieil infarctus occipital.
27	IV	3	6	84	M	Maladie à corps de Lewy diffus, forte probabilité *. AAC de type 2.
28	IV	0	0	90	F	Personne non démente présentant des lésions Tau assimilées à la MA.
29	V	4	0	76	M	MA.
30	V	5	6	81	M	MA, maladie à corps de Lewy diffus. Faible probabilité *.
31	V	4	6	76	F	MA, maladie à corps de Lewy diffus. Probabilité intermédiaire *.
32	V	5	0	92	M	MA, sclérose ammonienne et inclusions TDP-43.
33	V	4	6	87	M	MA, maladie à corps de Lewy diffus. Probabilité intermédiaire *.
34	V	4	0	81	F	MA.
35	V	4	Pathologie amygdalienne	96	F	MA, corps de Lewy amygdaliens.
36	V	5	6	80	M	MA, maladie à corps de Lewy diffus. Probabilité intermédiaire *.
37	V	5	6	74	F	MA, maladie à corps de Lewy diffus. Probabilité intermédiaire *.
38	VI	5	0	78	F	MA.
39	VI	3	0	86	M	MA.
40	VI	2	0	79	M	MA.
41	VI	5	Pathologie amygdalienne	73	F	MA, corps de Lewy amygdaliens.
42	VI	5	0	68	F	Atrophie corticale postérieure. MA.
43	VI	5	0	79	M	MA.
44	VI	5	0	60	M	MA.
45	VI	5	0	66	M	MA.
46	VI	4	0	79	M	MA.
47	VI	3	0	65	M	MA.

Analyses additionnelles (n = 6)

Cas	Braak (Tau)	Thal	Braak (α -Synuclein)	Age	Sexe	Diagnostic	Technique(s)
48	0	0	0	62	F	Syndrome de défaillance multiviscérale.	Microscopie électronique.
49	0	0	0	39	M	Gliome du tronc cérébral (piliers du fornix non impliqués).	Culture cellulaire.
50	IV	5	0	91	M	MA.	Culture cellulaire, microscopie électronique.
51	VI	5	Pathologie amygdalienne	61	F	MA, corps de Lewy amygdaliens.	Microcryodissection.
52	VI	5	0	81	F	MA.	CLARITY, microscopie électronique.
53	VI	5	0	76	M	MA.	Culture cellulaire.

Tableau 1 : Cas. Les cas sont classés selon les stades de Braak (Braak et Braak, 1991). Les colonnes « Braak (Tau) », « Thal » et « Braak (α -Synucléine) » indiquent respectivement les stades de Braak de la pathologie neurofibrillaire (Braak et Braak, 1991), les phases de Thal (Thal et al., 2002b) et les stades de Braak de la synucléinopathie associés à la maladie de Parkinson sporadique (Braak et al., 2003). L'hippocampe et le pilier du fornix ont été prélevés pour chacun des 47 cas composant la cohorte. L'hippocampe a été étudié à partir de sections coronales. Le pilier du fornix a été coupé parallèlement à son axe longitudinal. Le corps mamillaire a été analysé dans 41 cas (le corps mamillaire n'était pas disponible ou trop altéré pour être analysé dans les 6 cas restants). Six autres cas ont été prélevés (« **Analyses additionnelles** ») pour les techniques de microcryodissection, CLARITY (deux corps mamillaires formolés), microscopie électronique (trois coupes coronales d'hippocampe et trois coupes longitudinales de piliers du fornix formolés) et culture cellulaire (trois piliers du fornix congelés).

*MA : maladie d'Alzheimer ; AAC: Angiopathie Amyloïde Cérébrale ; MP : maladie de Parkinson ; * Probabilité que les lésions pathologiques observées soient à l'origine d'un syndrome clinique de type démence à corps de Lewy, selon les critères de McKeith et al. (McKeith et al., 2017).*

parallèlement à son axe longitudinal sur une distance d'au moins 1 cm. Des coupes de 3 μ m d'épaisseur ont été coupées au microtome.

Immunohistochimie

Les immunohistochimies ont été réalisées au moyen d'automates (Ventana Medical System Inc., Roche). Les sections déparaffinées et réhydratées ont été prétraitées et bloquées par de l'albumine de sérum bovin, puis incubées avec les anticorps primaires détaillés dans le **Tableau 2**. Les anticorps primaires anti-Tau (AT8, TG3, PHF1, Alz50, C3), anti-MBP et anti-APP ont été détectés par les kits de détection ultraView Universal DAB (diaminobenzidine ; Ventana Medical System Inc., Roche) ou OptiView DAB (Ventana Medical System Inc., Roche), selon la procédure automatisée résumée dans le **Tableau 2**. Les kits comprennent des anticorps secondaires (IgG de chèvre anti-souris, IgM de chèvre anti-souris et anti-lapin) conjugués à de la peroxydase de raifort (HRP). L'ajout de H₂O₂ et de DAB conduit à la formation d'un précipité brun en présence de HRP. L'immunohistochimie anti-A β 6F3D a été réalisée manuellement

après un prétraitement à l'acide formique (98% d'acide formique, pendant cinq minutes). L'anticorps primaire a été incubé à température ambiante pendant une nuit. Les doubles marquages anti-MBP/anti-Neurofilament et anti-A β /anti-Tau ont été réalisés en suivant le même protocole que celui décrit précédemment pour le premier anticorps primaire (anti-MBP et anti-A β 6F3D, respectivement). Le deuxième anticorps primaire (anti- Neurofilament et anti-Tau AT8, respectivement) a été révélé par le kit de détection ultraView Universal phosphatase alcaline (Ventana Medical System Inc., Roche), selon la procédure automatisée résumée dans le **Tableau 2**. Le kit de détection inclut des anticorps secondaires (IgG de chèvre anti-souris, IgM de chèvre anti-souris et anti-lapin) conjugués à la phosphatase alcaline et des réactifs (naphtol et Fast Red), conduisant à la formation d'un précipité rouge en présence de phosphatase alcaline. Les coupes ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline de Harris et déshydratées.

Tableau 2 : Anticorps primaires

Marquages simples					
Épitope (clone)	Type	Hôte	Dilution	Référence	Procédure
<i>α-synucléine agrégée (5G4)</i>	Monoclonal	Souris	1/2000	MABN389, Merck Millipore	Prétraitement (solution CC1, 100 ° C, 32 min), anticorps primaire (37 ° C, 2 h), anticorps secondaire et détection (kit de détection OptiView DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 20 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 8 min).
<i>β-amyloïde humain (6F3D)</i>	Monoclonal	Souris	1/200	M0872, Dako	Manuellement : acide formique 98% (5 min), anticorps primaire (température ambiante, pendant la nuit), anticorps secondaire (1 h), détection (kit DAB), contre-coloration (hématoxyline de Harris, 5-15 s), post-contre-coloration (H ₂ O, 5 min).
<i>APP, protéine précurseur de l'amyloïde, aa 66-81 (22C11)</i>	Monoclonal	Souris	1/100	14-9749-80, Thermo Scientific	Prétraitement (solution CC1, 95 ° C, 8 min), anticorps primaire (37 ° C, 32 min), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 8 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 4 min).
<i>Tau aa 2-10 et 312-342 (Alz50) (Carmel et al., 1996; Wolozin et al., 1986)</i>	Monoclonal	Souris	1/100	Don de P. Davies.	Prétraitement (solution CC2, 95 ° C, 40 min), anticorps primaire (37 ° C, 1 h), anticorps secondaire et détection (kit de détection OptiView DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 8 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 4 min).
<i>Tau-p Ser202/Thr205 (AT8) (Goedert et al., 1995; Mercken et al., 1992)</i>	Monoclonal	Souris	1/500	MN1020, Thermo Scientific	Prétraitement (solution CC1, 95 ° C, 8 min), anticorps primaire (37 ° C, 32 min), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 16 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 8 min).
<i>Tau-p Ser396/Ser404 (PHF1) (Greenberg et al., 1992; Otvos et al., 1994)</i>	Monoclonal	Souris	1/500	Don de P. Davies.	Prétraitement (solution CC2, 95 ° C, 24 min), anticorps primaire (37 ° C, 32 min), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 8 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 4 min).
<i>Tau-p Thr231/Ser235 (TG3) (Jicha et al., 1997; Vincent et al., 1996)</i>	Monoclonal	Souris	1/ 100	Don de P. Davies.	Prétraitement (solution CC2, 95 ° C, 24 min), anticorps primaire (37 ° C, 32 min), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 8 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 4 min).
<i>Tau tronquée en Asp421 (C3) (Gambin et al., 2003)</i>	Monoclonal	Souris	1/1000	36-017, Merck	Prétraitement (solution CC2, 95 ° C, 36 min), anticorps primaire (37 ° C, 32 min), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 8 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 4 min).
<i>TDP-43</i>	Polyclonal	Lapin	1/2000	10782-2-AP, Proteintech	Prétraitement (solution CC1, 95 ° C, 8 min), anticorps primaire (37 ° C, 1 h 20 min), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal DAB), contre-coloration (hématoxyline II, 8 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 4 min)

Marquages doubles

Épitope (clone)	Type	Hôte	Dilution	Référence	Procédure
<i>β</i> -amyloïde humain (6F3D)	Monoclonal	Souris	1/200	M0872, Dako	Acide formique 98% (5 min), prétraitement (solution CC1, 95 ° C, 8 min), anticorps primaire (anti-Aβ 6F3D, température ambiante, pendant la nuit), anticorps secondaire et détection (kit de détection OptiView DAB), dénaturation (90 ° C, 4 min), prétraitement (solution CC1, 95 ° C, 64 min), anticorps primaire (anti-Tau AT8, 37 ° C, 2 h), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red), contre-coloration (hématoxyline II, 12 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 8 min).
Tau-p Ser202/Thr205 (AT8)	Monoclonal	Souris	1/500	MN1020, Thermo Scientific	
MBP, protéine basique de la myéline humaine	Polyclonal	Lapin	1/2000	A0623, Dako	Prétraitement (solution CC1, 95 ° C, 36 min), anticorps primaire (anti-MBP, 37 ° C, 1 h), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal DAB), dénaturation (60 ° C, 8 min), anticorps primaire (anti-NF, 37 ° C, 20 min), anticorps secondaire et détection (kit de détection ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red), contre-coloration (hématoxyline II, 8 min), post-contre-coloration (Bluing Reagent, 4 min).
Neurofilament humain (2F11)	Monoclonal	Souris	1/2000	M0762, Dako	

CC1 solution: ULTRA Cell Conditioning solution 1 (Ventana Medical System Inc., Roche).

CC2 solution: ULTRA Cell Conditioning solution 2 (Ventana Medical System Inc., Roche).

Elles ont été montées entre lame et lamelle au Pertex (Histolab, Labelians).

Imprégnation argentique de Gallyas

La technique d'imprégnation argentique de Gallyas a été appliquée (Gallyas, 1971), en incorporant les modifications proposées par Uchihara et al. (Uchihara et al., 1995) afin d'empêcher la coloration non spécifique de la myéline. Les coupes déparaffinées et réhydratées ont été prétraitées par une solution à 0,3% de permanganate de potassium (10 min), rincées à l'eau distillée puis plongées dans une solution d'acide oxalique à 1% (1 min). Après un lavage à l'eau distillée, les coupes ont été immergées dans de l'acide périodique à 5% (5 min), puis lavées à nouveau avant d'être imprégnées dans une solution alcaline d'iodure d'argent (hydroxyde de sodium 4%, iodure de potassium 10% et 0,035% de nitrate d'argent ; 1 min). Après une incubation dans de l'acide acétique à 0,5% (10 min), les coupes ont été plongées dans le révélateur (10 volumes d'une solution à 5% de carbonate de sodium ; 3 volumes d'une solution à 0,2% de nitrate d'ammonium, 0,2% de nitrate d'argent et 1% d'acide tungstosilicique ; 7 volumes d'une solution à 0,2% de nitrate d'ammonium, 0,2% de nitrate d'argent, 1% d'acide tungstosilicique et 0,30% de formaldéhyde ; 15-20 min). Le développement a été arrêté par immersion des lames dans une solution d'acide acétique à 0,5% (3 min). Les coupes ont été lavées puis incubées dans une solution de chlorure d'or à 0,1% (5 min), lavées à l'eau distillée, puis stabilisées dans du thiosulfate de sodium à 1% (5 min) et rincées à l'eau courante. Les coupes ont été contre-colorées avec du rouge nucléaire à 0,1% et déshydratées. Elles ont été montées entre lame et lamelle au Pertex (Histolab, Labelians).

Quantifications

Une zone couvrant toute l'épaisseur du **subiculum** a été systématiquement observée à l'objectif x20 après les immunomarquages anti-Tau (AT8, TG3, Alz50, PHF1 et C3) et la coloration de Gallyas. Cent profils neuronaux ont été examinés. La proportion de profils neuronaux (nombre total de neurones en dénominateur) présentant des pré-DNF, des DNF et des DNF fantômes a été évaluée. Une étude pilote (Gundersen et al., 1988) avait déterminé au préalable que le coefficient d'erreur ne présentait plus d'amélioration au-delà de 100 profils évalués. Les pourcentages de profils neuronaux marqués ont été convertis selon une échelle allant de 0 à 3 (0 : 1% ou moins ; 1 : de 2 % à 34% ; 2 : de 35% à 67% ; 3 : 68% ou plus). La densité volumique des dépôts d'A β dans le subiculum a été estimée par comptage de points après immunohistochimie anti-A β 6F3D (Weibel, 1979). Une caméra vidéo transmettait l'image du subiculum sur un écran, sur lequel une grille de points était superposée. Les points étaient régulièrement espacés à des intervalles de 80 μ m (9 lignes x 12 colonnes). La proportion du nombre de points localisés sur du matériel immunoréactif sur un nombre total de 100 points (\pm 10, selon la taille du subiculum) a été évaluée, afin d'estimer la densité surfacique des dépôts AA [nombre de points tombant sur le matériel immunoréactif A β]/[nombre total de points]. AA est un estimateur non biaisé du rapport volumique VV [volume des dépôts A β]/[volume total], selon le principe de Delesse (AA = VV) (Weibel, 1979). La répartition des dépôts d'A β étant hétérogène, nous avons choisi de privilégier les zones où la densité locale était la plus importante : l'évaluation concernait donc la proportion de volume la plus élevée (plutôt que moyenne). Dans le **pilier du fornix**, les densités numériques de fibres tortueuses enrichies en Tau (AT8, TG3, Alz50, PHF1, C3 ou Gallyas positives), de sphéroïdes axonaux, d'axones démyélinisés, de cellules CD68 positives et d'accumulations axonales d'APP ont été évaluées semi-quantitativement sur des coupes longitudinales. L'échelle suivante a été appliquée : 0 : pas de lésion ; 1 : lésions rares et éparses ; 2 : lésions de densité intermédiaire ou hétérogène ; 3 : lésions abondantes sur l'ensemble de la coupe. Dans le **corps mamillaire**, la proportion en volume des dépôts d'A β a été déterminée par la méthode du comptage de points décrite plus haut. Les densités des pré-DNF ou DNF AT8, TG3, Alz50, PHF1, C3 et Gallyas positives ont été évaluées semi-quantitativement comme évoqué précédemment (grades 0 à 3), de même que la densité des lésions APP positives (neurites isolés, plaques synaptiques et plaques dystrophiques).

Cartes de densité des lésions du corps mamillaire

La tessellation de Voronoï (ou de Dirichlet) a permis de dresser des cartes quantitatives représentant les densités numériques locales des lésions A β et Tau dans le corps mamillaire (Duyckaerts et al., 1994). Les cartes ont été dessinées au moyen d'un système vidéo, de capteurs de déplacement linéaires fixés à la platine mobile du microscope et d'un ordinateur. L'image microscopique était visible sur l'écran de l'ordinateur. La souris a permis de dessiner le contour des régions d'intérêt – en l'occurrence des noyaux médial et latéral du corps mamillaire – et de pointer les accumulations d'A β et les profils neuronaux Tau-p positifs après immunohistochimie anti-A β 6F3D et anti-Tau-p AT8, respectivement. Les capteurs de déplacement permettaient d'associer l'ensemble des points dessinés à une paire de coordonnées X et Y (Grignon et al., 1998) et garantissaient que ces points suivaient les mouvements de la platine du microscope. Des cartes des dépôts d'A β et des profils neuronaux Tau-p AT8 positifs ont été obtenues. Les coordonnées des bordures des noyaux médial et latéral du corps mamillaire et des lésions pointées ont été conservées dans un fichier à l'issue de l'étape d'acquisition. Ces coordonnées ont été utilisées pour analyser les données avec un programme de tessellation spécialement conçu. Chaque région a été divisée en polygones, limités par des côtés situés à mi-distance de deux lésions voisines et perpendiculaires à la droite qui les reliait. Chaque polygone ne contenait qu'une seule lésion marquée (dépôt A β ou enchevêtrement neurofibrillaire). Les polygones couvraient toute la région sans chevauchements ni interstices, *i.e.* constituaient une « tessellation » du plan. L'aire de chaque polygone individuel est inversement proportionnelle à la densité numérique des lésions pointées qu'il contient. Lorsque la densité est élevée, les lésions sont proches les unes des autres et les polygones sont petits. L'attribution d'une gamme de couleurs dépendante de l'aire des polygones obtenus a permis de générer une carte de densités numériques locales des lésions (Duyckaerts et al., 1994; Duyckaerts et Godefroy, 2000).

Ensemencement *in vitro*

Préparation d'homogénats de pilier du fornix

Le pilier du fornix a été prélevé pour les cas 49, 50 et 53 énumérés dans le **Tableau 1**. Les prélèvements ont été réalisés sur du tissu frais immédiatement après l'autopsie, puis congelés et stockés à – 80°C. Les prélèvements, à la sortie du congélateur, ont été placés sur de la glace et disséqués à nouveau pour ne contenir que de la substance blanche. Environ 100 mg

de tissu ont été obtenus pour chaque cas. Les étapes suivantes ont été réalisées sur de la glace. Les tissus ont été broyés dans un tampon phosphate salin (PBS) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Thermo Scientific), au moyen d'un homogénéisateur en verre de 1 ml (Fisher Scientific) dont le piston a été actionné 15 à 20 fois. Un homogénat à 10% poids/volume a ainsi été obtenu pour chaque cas. Les homogénats ont été brièvement soniqués au moyen d'un sonicateur Misonix Q125 (Q-sonica) puis clarifiés par centrifugation (3000 g, 5 min, 4 ° C), selon la méthode précédemment décrite (Clavaguera et al., 2009). Les surnageants obtenus ont été collectés, aliquotés et stockés à -80 ° C.

Préparation et traitement des biosenseurs cellulaires sensibles à l'ensemencement de Tau

Les cellules biosenseurs HEK Tau RD P301S (#CRL-3275, ATCC, LGC Standards ; Holmes et al., 2014) co-expriment sur deux transgènes indépendants la protéine Tau P301S couplée à la Cyan Fluorescent Protein (CFP) et la protéine Tau P301S couplée à la Yellow Fluorescent Protein (YFP, ce fluorochrome n'ayant pas été analysé dans cette étude). Ces biosenseurs cellulaires ont été cultivés dans un milieu de culture complet (DMEM avec 10% de sérum de veau foetal et 1% de pénicilline/streptavidine, Gibco, Thermo Fisher Scientific). Les cellules ont été traitées par des homogénats de piliers du fornix clarifiés en suivant le protocole original (Furman et al., 2015; Holmes et al., 2014), avec quelques modifications mineures permettant une analyse morphologique des cellules au confocal. Environ 170 000 cellules contenues dans 650 µL de milieu complet ont été ensemencées par puits d'une plaque de 24 puits et laissées une nuit dans l'incubateur (37 ° C, 5% CO₂ et ≥ 80% humidité relative). Lorsque les cellules atteignaient environ 60% de confluence, 100 µL d'un mix de transduction a été ajouté par puits en duplicat. Ce mix de transduction contenait 43,75 µL d'Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) et 6,25 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), combinés à un mélange de 12,5 µL d'homogénat clarifiés et de 37,5 µL d'Opti-MEM. Le mix de transduction a été rapidement centrifugé, puis incubé 1 heure à température ambiante, avant d'être déposé lentement dans les puits. Les cellules traitées ont été laissées dans l'incubateur pendant 48 h, puis ont été rincées au PBS et ré-ensemencées sur des lamelles de 13 mm de diamètre recouvertes de poly-D-lysine (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été laissées une nuit dans l'incubateur, avant d'être rincées au PBS puis fixées 10 minutes au paraformaldéhyde à 4%. Les cellules ont été contre-colorées avec du DAPI dans 0,05% de Triton-X100 durant 10 minutes. Les lamelles montées au Fluoromount (Sigma-Aldrich) ont été stockées à l'abri de la lumière à 4 °C jusqu'à leur observation. L'expérience a été répétée trois fois.

Analyse

Les cellules ont été analysées avec un confocal inversé Leica TCS SP8 DLS (Leica Microsystems). Le pourcentage de cellules comportant des agrégats de Tau P301S CFP positives a été évalué à partir d'images acquises au confocal.

Immunodosage A β

Un dosage ELISA des peptides A β 40 et A β 42 dans les homogénats de piliers du fornix clarifiés a été réalisé avec le kit V-PLEX Plus A β Peptide Panel 1 6E10 (Meso Scale Discovery), en suivant les instructions du fournisseur. Un homogénat à 10% poids/volume de cortex frontal dérivé d'un cerveau Alzheimer (Braak VI, Thal 5) et clarifié par centrifugation (3000 g, 5 min, 4 ° C) a été utilisé comme contrôle positif.

Microscopie électronique

Les accumulations de Tau-p AT8 positives, observées dans le pilier du fornix, ont été examinées en microscopie électronique. Le subiculum et le pilier du fornix ont été échantillonnés à partir de deux cerveaux Alzheimer fixé au formaldéhyde (cas 50 et 52). Un pilier du fornix supplémentaire a été prélevé sur un encéphalé fixé au formol et dépourvu de lésions associées à la MA, utilisé comme témoin (cas 48). Des coupes de 200 μ m d'épaisseur ont été effectuées au vibratome VT 1000S (Leica Microsystems). Les piliers du fornix ont été coupés parallèlement à leur axe longitudinal. Un immunomarquage anti-Tau-p AT8 révélé par des microparticules d'or a été réalisé, mais cette technique s'est avérée incompatible avec le matériel *post-mortem* fixé au formol dont nous disposons : aucune accumulation de Tau-p n'a été détectée, seul un marquage diffus et non spécifique ayant été obtenu (y compris dans le témoin négatif). Nous avons donc observé les précipités de diaminobenzidine générés après immunohistochimie anti-Tau-p AT8 réalisée sans prétraitement et sans détergent sur les coupes de 200 μ m. Les régions d'intérêt ont été disséquées (environ 1 mm²). Les échantillons ont été lavés dans du tampon phosphate et transférés dans une solution d'osmium à 1% pendant 1 h. Après plusieurs lavages à l'eau, les échantillons ont été colorés « en bloc » avec une solution d'acétate d'uranyle à 5% pendant 30 min. Les tissus ont été déshydratés dans des gradients croissants d'éthanol (de 50% à 100%) puis dans de l'acétone. Ils ont ensuite été incubés dans une solution à 50% d'acétone et 50% d'Epon pendant une nuit, avant d'être placés dans de l'Epon pur durant 2 h puis durcis à 60 °C pendant 48 h dans une étuve à sec. Des coupes semi-fines (0,5 μ m) et ultra-fines (70 nm) ont été réalisées au moyen d'un ultra-microtome EM UC7

(Leica Microsystems). Des coupes ultra-fines ont été recueillies sur des grilles de cuivre et analysées au microscope électronique Hitachi HT700 (Hitachi, Milexia) à 100 kV. Les photos ont été acquises avec une caméra CCD AMT R41-B 2048 X 2048 (AMT, Milexia).

Microcryodissection

Un corps mamillaire, fixé au formol, a été prélevé dans un cas de MA (Braak VI, Thal 5 ; cas 51). L'échantillon a été microcryodisséqué par la méthode élaborée au laboratoire (Thierry et al., 2017 ; cf. partie « Publications »). Le principe de cette technique est le suivant : en congelant, l'eau contenue dans l'espace interstitiel des tissus se dilate et écarte les constituants histologiques, permettant à un plus grand volume d'eau de s'infiltrer après décongélation. Des cycles de congélation et de décongélation dissocient de cette manière les éléments du tissu. L'échantillon, d'une superficie d'environ 0,5 x 1 cm² et d'une épaisseur de 4 mm, a été soumis à des cycles de congélation/décongélation induits par un système automatisé que nous avons développé. Ce système est composé d'un refroidisseur thermoélectrique Peltier (TEC1-12706, Hebei I.T., Shanghai, Chine) relié à une alimentation 12 V, 5 A. Lorsqu'il est alimenté, le module Peltier produit une différence de température d'environ 70°C entre ses deux faces. La température de la face froide descend en-dessous de zéro et permet la congélation de l'échantillon. La face chaude doit être refroidie par un dissipateur thermique associé à un ventilateur. Le dissipateur thermique et le ventilateur ont été prélevés sur une alimentation électrique usagée d'un ordinateur et étaient alimentés par une prise USB. Le circuit était interrompu par un relai connecté à un ordinateur par une prise USB (USB one relay, KMtronic Ltd, Bulgarie). Un cycle constitué d'une période de 700 s en marche (congélation) et d'une période de 300 s en arrêt (décongélation et refroidissement du côté chaud du module Peltier) a été programmé par un ensemble de lignes de commande stockées dans un fichier batch. L'échantillon a été soumis à la répétition de 320 cycles de congélation/décongélation, sur une durée totale de 5000 min (soit d'environ 3 jours et demi). Le corps mamillaire microcryodisséqué a été inclus dans de la paraffine. Des coupes de 3 µm ont été effectuées au microtome puis analysées par immunohistochimie comme décrit précédemment.

CLARITY

Préparation des échantillons

Un corps mamillaire de 3 mm d'épaisseur a été prélevé dans un cas de MA (durée de fixation dans une solution de formol à 10 % < 1 an ; Braak VI, Thal 5 ; cas 52) et soumis au

protocole de CLARITY adaptée au tissu humain *post-mortem* au laboratoire (Ando et al., 2014). Le prélèvement a été incubé dans une solution d'acrylamide monomérique (4% d'acrylamide et 0,25% de VA-044 azo-initiateur dans du PBS ; 7 jours, 4 ° C). L'échantillon a été dégazé dans une chambre de dessiccation, où l'oxygène (qui empêche la polymérisation) a été remplacé par de l'azote. Une incubation de 48 h à 37 ° C a permis la polymérisation de l'acrylamide. L'échantillon inclus dans un hydrogel d'acrylamide a été rincé dans une solution de clarification (200 mM d'acide borique, 4% de SDS, pH 8,5 ; 4 lavages sur 48 h, température ambiante).

Clarification active

L'échantillon a été placé dans l'appareil de clarification active X-CLARITY (Logos Biosystems Inc.). Un courant continu (1,5 A) et un flux constant de solution de clarification chauffée à 40 ° C ont été appliqués durant 96 h. La solution de clarification a été renouvelée toutes les 24 h.

Immunomarquages

Le tissu clarifié a été prétraité à l'acide formique à 98% pendant 15 minutes. L'échantillon a ensuite été bloqué par un mélange en volume égal de sérum de chèvre et d'âne (10% de sérums, 0,1% d'azide de sodium dans du PBS-T (PBS à 0,1% de triton-X) ; 5 heures, température ambiante). L'échantillon a été incubé avec un anticorps monoclonal de souris anti-A β (4G8, BioLegend) et un anticorps polyclonal de lapin anti-total-Tau (B19, don de J.-P. Brion, Université libre de Bruxelles, Belgique). Ces anticorps ont été dilués au 1:100 dans du PBS-T contenant 5% de sérums de chèvre et d'âne et 0,1% d'azide de sodium (5 jours, 37 ° C). Des anticorps d'âne anti-souris Alexa 488 et de chèvre anti-lapin Alexa 555 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) ont été utilisés comme anticorps secondaires, dilués au 1:200 dans du PBS-T contenant 5% de sérums de chèvre et d'âne et 0,1% d'azide de sodium (5 jours, 37 ° C). Le tissu a été post-fixé dans du paraformaldéhyde (4% de paraformaldéhyde dans du PBS ; 1h30, température ambiante) et l'autofluorescence a été inhibée par la glycine (glycine 0,2 M dans du PBS ; 1h30, température ambiante). L'échantillon a finalement été conservé dans du PBS à 0,1% d'azide de sodium, à 4 ° C, à l'abri de la lumière.

Analyses microscopiques.

La veille de l'observation, l'échantillon a été monté sur une lame dans du RapidClear®. Les analyses au microscope ont été réalisées au multiphoton droit Zeiss 710 NLO (Carl Zeiss

Microscopy). Les images ont été post-analysées avec Fiji (Fiji Is Just ImageJ, National Institutes of Health) et Imaris (Bitplane, Oxford Instruments).

Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées avec GraphPad Prism 6, au risque d'erreur de type 1 à 5%. Les données neuropathologiques, ne suivant pas une distribution normale, ont été analysées par des tests statistiques non paramétriques : le test de Spearman a été utilisé pour l'analyse de la corrélation, les tests de Kruskal-Wallis et Friedman ont été utilisés pour l'analyse unidirectionnelle de la variance (pour les données non appariées ou appariées), suivis du post-test de Dunn pour analyser les comparaisons multiples lorsque l'hypothèse nulle était rejetée. Les moyennes des groupes de cas présentant ou non des corps de Lewy ont été comparées par un test de Mann-Whitney. Dans les expériences d'ensemencement des biosenseurs cellulaires, le nombre de cellules HEK comportant des inclusions intracellulaires de Tau P301S CFP positives a été exprimé en pourcentage du nombre total de cellules comptées. Les pourcentages moyens ont été comparés par un t-test de Student, effectué après une transformation $\text{Arcsin}(\sqrt{x})$ des données (comme recommandé (Snedecor et Cochran, 1980), afin d'approcher une distribution normale).

Résultats

1. Distribution des pathologies A β et Tau dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire

1.1. Accumulation d'A β dans le système subiculo-fornico-mamillaire

L'immunohistochimie anti-A β a révélé la présence de dépôts d'A β dans le subiculum et dans le corps mamillaire (**Figures 12a et 12c**). En revanche, aucune accumulation d'A β n'a été détectée dans le pilier du fornix (**Figure 12b**). Ce résultat a été confirmé par des immunodosages d'A β 40 et d'A β 42 dans des homogénats de pilier du fornix clarifiés obtenus à partir de trois cas présentant des lésions associées à la MA de sévérités variées (cas 49, 50 et 53) : un cas de contrôle (Braak 0, Thal 0) ; un cas intermédiaire (Braak IV, Thal 5) et un cas sévèrement affecté (Braak VI, Thal 5). Dans les homogénats de pilier du fornix, les concentrations d'A β 40 et d'A β 42 étaient respectivement inférieures à 2% et 8,5% des valeurs du témoin positif, correspondant à un homogénat de cortex d'un cas de MA sévère (Braak VI, Thal 5). Les proportions volumiques des dépôts d'A β dans le subiculum et dans le corps mamillaire étaient positivement corrélées (test de Spearman, $\rho_S = 0,720$, $p < 0,0001$). Des dépôts d'A β ont été observés dans le subiculum de 27 cas, en l'absence de dépôts dans le corps mamillaire pour deux d'entre eux. En revanche, la présence de dépôts d'A β dans le corps mamillaire de 25 cas était systématiquement associée à des dépôts d'A β dans le subiculum (**Figures 12g et 12i**). La pathologie de Lewy n'influçait pas l'accumulation d'A β (test de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

1.2. Accumulation de Tau-p dans le système subiculo-fornico-mamillaire

Les pré-DNF, DNF et DNF fantômes ont été évaluées dans le subiculum et le noyau médial du corps mamillaire (**Figures 12d et 12f**). Seuls des axones tortueux Tau-p AT8 positifs, fins et fragmentés, ont été observés dans le pilier du fornix (**Figure 12e**). Trois groupes de cas (contrôle, intermédiaire, sévère) ont ensuite été considérés selon les stades neurofibrillaires de Braak (**Figure 12j**). Dans les huit cas de contrôle (Braak 0/I/II), aucune immunoréactivité Tau-p AT8 n'a, par définition, été observée dans le subiculum ; le pilier du fornix et le corps mamillaire étaient également dépourvus de toute accumulation de Tau-p. Dans les 20 cas intermédiaires (Braak III/IV), des accumulations de Tau-p ont été détectées dans le subiculum et le pilier du fornix mais étaient plus rares dans le corps mamillaire. Dans les 19 cas sévèrement affectés (Braak V/VI), la pathologie Tau était abondante dans le subiculum, le pilier du fornix et, dans une moindre mesure, dans le corps mamillaire. La densité numérique de la pathologie Tau dans le pilier du fornix était corrélée avec les densités numériques de la pathologie

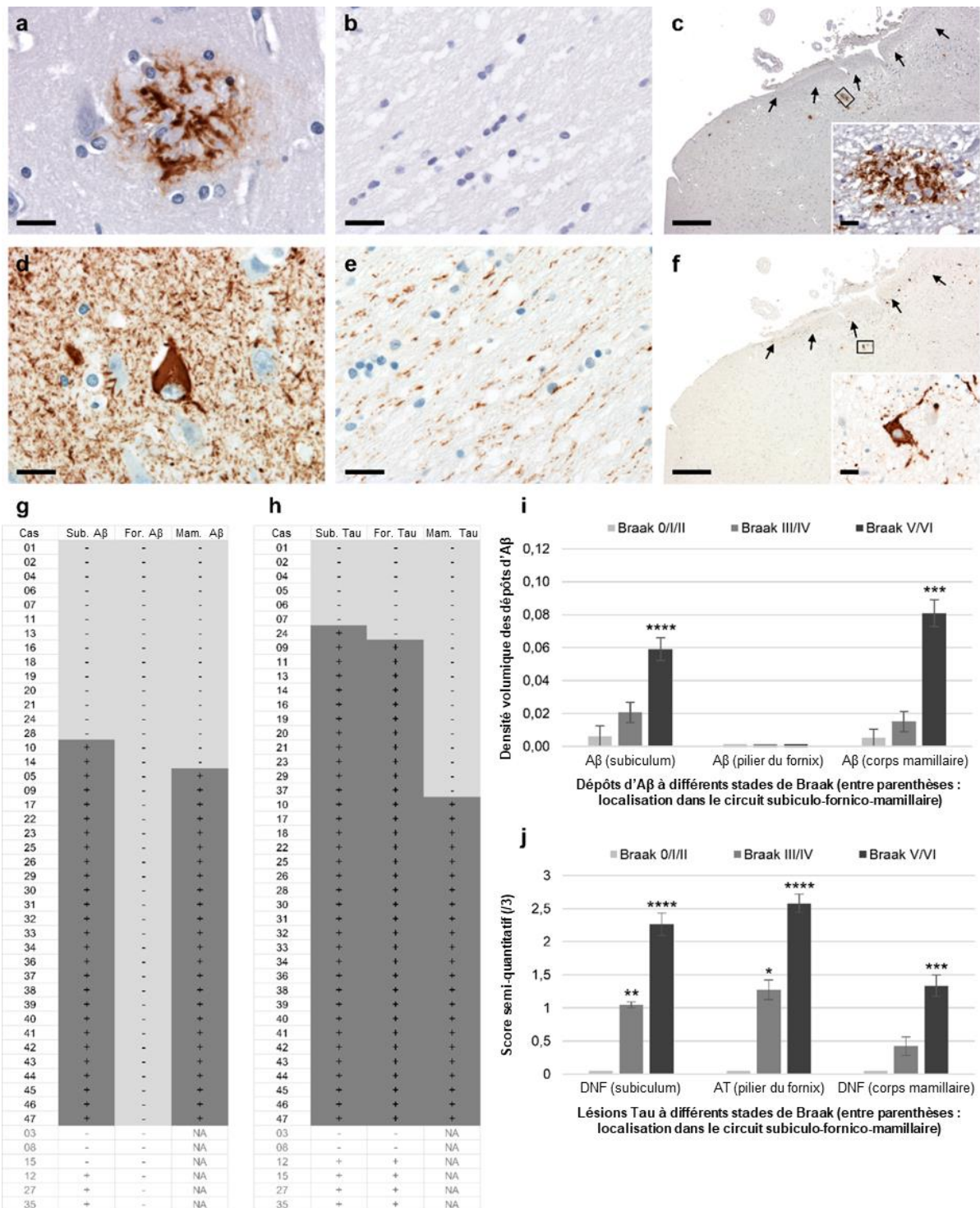


Figure 12 : Les pathologies Aβ et Tau progressent de façon antérograde dans le système subiculo-fornico-mamillaire, seule la pathologie Tau étant détectée dans le pilier du fornix. Toutes les photos sont issues du cas 30. a) Dépôts d'Aβ dans le subiculum, immunohistochimie anti-Aβ 6F3D (barre d'échelle : 20 μm). b) Aucune accumulation d'Aβ n'a été détectée dans le pilier du fornix après immunohistochimie anti-Aβ 6F3D (barre d'échelle : 20 μm). c) Dépôts d'Aβ dans le corps mamillaire, immunohistochimie anti-Aβ 6F3D (barre d'échelle : 400 μm). Encart : grossissement du rectangle montrant un dépôt d'Aβ (barre d'échelle : 20 μm). d) DNF dans le subiculum, immunohistochimie anti-Tau-p AT8 (barre d'échelle : 20 μm). e) Axones tortueux correspondant à des axones Tau-p AT8 positifs fins et fragmentés, dans le pilier du fornix (barre d'échelle : 20 μm). f) Pathologie Tau (pré-

DNF et DNF) dans le corps mamillaire après immunohistochimie anti-Tau-p AT8. De nombreux axones tortueux ont été observés en périphérie du corps mamillaire, au niveau de l'arrivée du pilier du fornix (barre d'échelle : 400 μm). Encart : grossissement du rectangle montrant un neurone Tau-p AT8 positif (barre d'échelle : 20 μm). g) Absence (-, gris clair) ou présence (+, gris foncé) de dépôts d'A β dans le subiculum (Sub.), le pilier du fornix (For.) et le corps mamillaire (Mam.). h) Absence (-, gris clair) ou présence (+, gris foncé) de pré-DNF, DNF et DNF fantômes dans le subiculum (Sub.) et le corps mamillaire (Mam.), et d'axones tortueux dans le pilier du fornix (For.). i) Densité volumique moyenne des dépôts d'A β en fonction des stades de Braak (post-test de Kruskal-Wallis et Dunn en comparaison avec le groupe de cas de contrôle de stades de Braak 0/I/II, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne. j) Densité numérique moyenne (score semi-quantitatif) des lésions Tau-p AT8 positives en fonction du stade de Braak, dans le subiculum, le pilier du fornix et le corps mamillaire (post-test de Kruskal-Wallis et Dunn en comparaison avec le groupe de cas de contrôle de stades de Braak 0/I/II : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). DNF : dégénérescences neurofibrillaires, AT : axones tortueux. Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne. NA : donnée non disponible ; six corps mamillaires n'ont pas pu être prélevés, les six cas correspondants ont été exclus des analyses de distributions hiérarchiques (en gris, fin des tableaux).

Figure 12 tirée de Thierry et al., 2019.

Tau du subiculum (test de Spearman, $\rho_S = 0,885$, $p < 0,0001$) et du corps mamillaire (test de Spearman, $\rho_S = 0,724$, $p < 0,0001$). Les accumulations de Tau-p dans le subiculum, le pilier du fornix et le corps mamillaire ont pu être classées hiérarchiquement au sein de la cohorte. Alors que les DNF observées dans le subiculum étaient associées à la présence d'axones tortueux dans le pilier du fornix dans tous les cas sauf un, les axones tortueux observés dans le pilier du fornix étaient systématiquement associés à la présence de DNF dans le subiculum. De même, des axones tortueux ont été observés dans le pilier du fornix en l'absence de DNF dans le corps mamillaire, tandis que les DNF dans le corps mamillaire étaient toujours associées à la présence d'axones tortueux dans le pilier du fornix (**Figure 12h**). La pathologie de Lewy n'influçait pas l'abondance ni la topographie de la pathologie Tau (test de Mann-Whitney, $p > 0,05$).

1.3. Topographie des accumulations d'A β et de Tau-p dans le corps mamillaire

Dans le corps mamillaire, les dépôts d'A β étaient distribués soit en périphérie, soit au centre, ou simultanément en périphérie et au centre du noyau médial du corps mamillaire. Les dépôts d'A β périphériques constituaient une zone circulaire entourant le noyau médial du corps mamillaire ; ils étaient stellaires ou diffus, aux contours irréguliers. Les dépôts centraux étaient sphériques et pouvaient être diffus ou focaux (**Figures 13a, 13c et 13e**). Les distributions périphériques de dépôts d'A β ont été principalement observées parmi les cas les moins

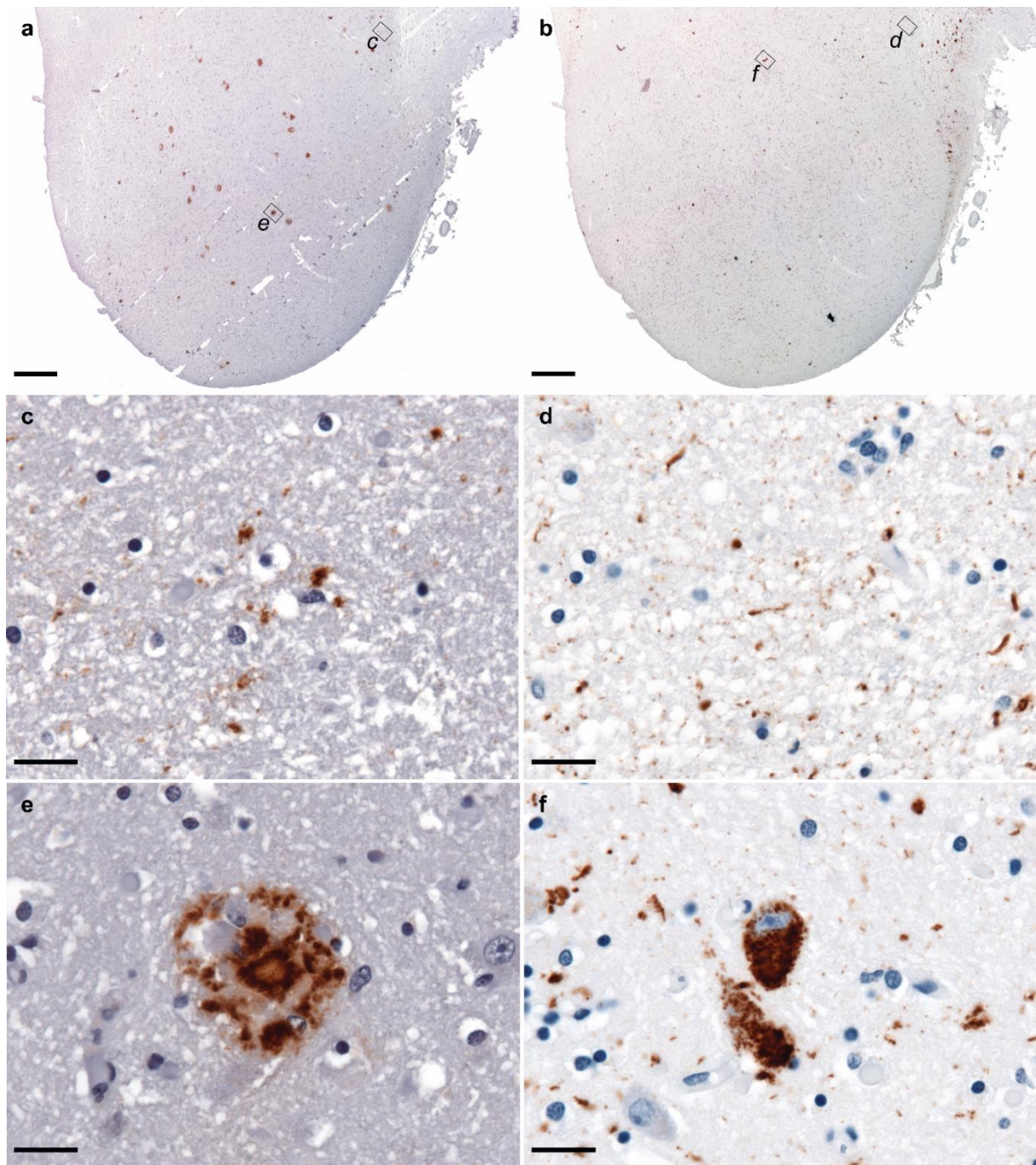


Figure 13 : Dépôts d'Aβ extracellulaires et accumulations intraneuronales de Tau-p dans le corps mamillaire. a) Dépôts d'Aβ dans le corps mamillaire, immunohistochimie anti-Aβ 6F3D (barre d'échelle : 400 μm). b) Pathologie Tau (pré-DNF, DNF et fibres tortueuses) dans le corps mamillaire, immunohistochimie anti-Tau-p AT8 (barre d'échelle : 400 μm). c) et e) Observation à plus fort grossissement des rectangles représentés en a), montrant c) un dépôt stellaire périphérique et e) un dépôt focal et neuritique central. Barres d'échelle : 20 μm. d) et f) Observation à plus fort grossissement des rectangles représentés en b), montrant d) des fibres tortueuses à la périphérie du corps mamillaire où arrive le pilier du fornix et f) des dégénérescences neurofibrillaires. Barres d'échelle : 20 μm.

Figure 13 tirée de Thierry et al., 2019.

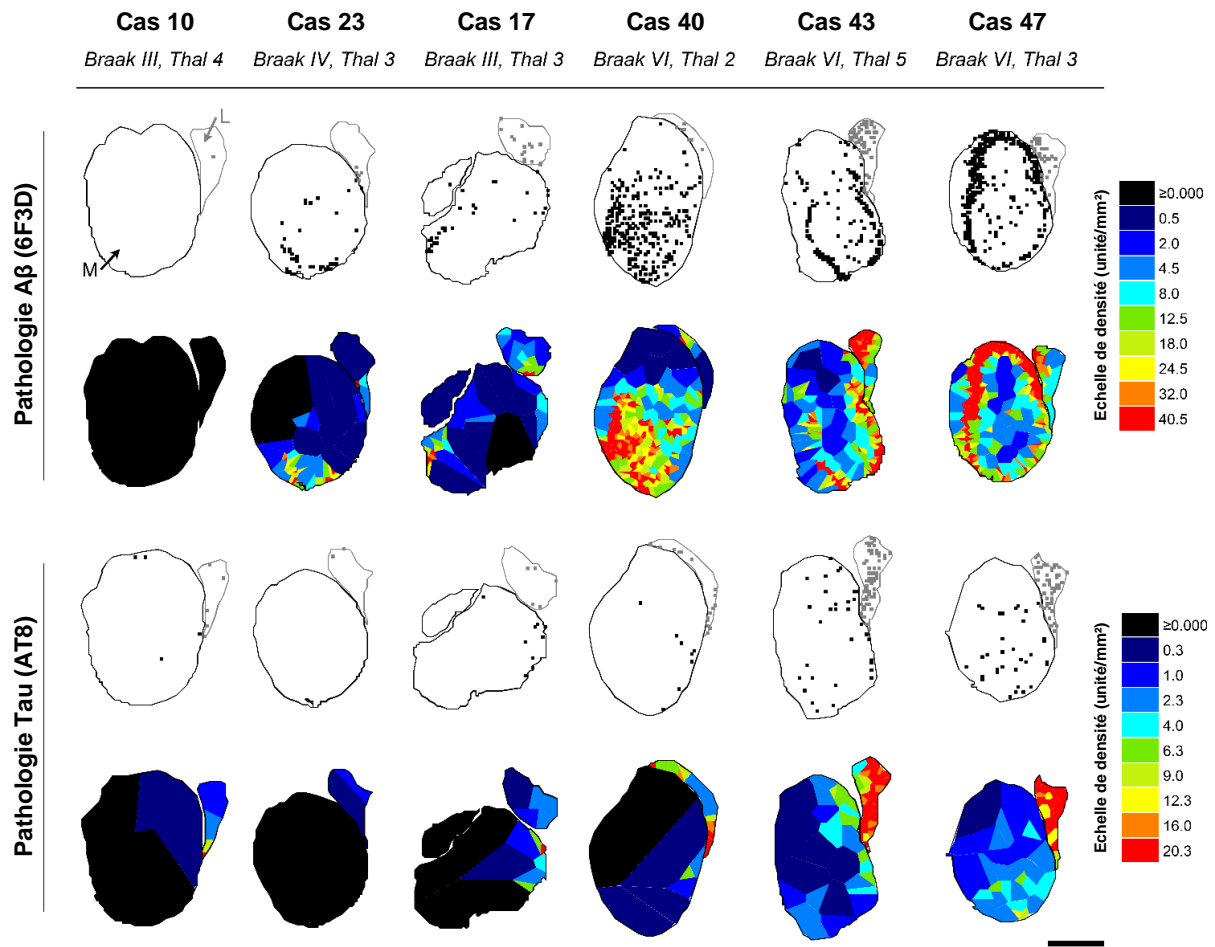


Figure 14 : Cartes de densité des dépôts extracellulaires d'A β et des accumulations intraneuronales de Tau-p dans le corps mamillaire. Les cartes ont été obtenues à partir de six cas *post-mortem* (listés en colonnes), présentant des sévérités variées des pathologies A β et Tau dans le corps mamillaire. Lignes 1 et 3 : cartes dans lesquelles la position des dépôts extracellulaires A β 6F3D positifs (ligne 1) ou des accumulations intraneuronales Tau-p AT8 positives (ligne 3) est indiquée par un point. Noir : noyau médian (M) et gris : noyau latéral (L) du corps mamillaire. Lignes 2 et 4 : cartes de densité des lésions A β (ligne 2) ou Tau (ligne 4) obtenues après une tessellation de Voronoï. Les polygones dessinés couvrent la surface du corps mamillaire sans interstice ni chevauchement. Chaque polygone ne contient qu'un seul point (correspondant à une lésion pointée) et est limité par des lignes tracées à mi-distance entre le point inclus et ses voisins. Chaque point du plan enfermé dans un polygone est plus proche du point qu'il contient que de tout autre point de la carte. La densité numérique est inversement proportionnelle à la surface du polygone (les polygones sont grands lorsque les lésions sont éparées et petits lorsqu'elles sont proches les unes des autres). Échelles de couleur : échelles de densité locale en unité/mm². Notez que dans le cas 40, la distribution des dépôts d'A β était principalement centrale alors qu'elle était périphérique et centrale dans les cas 43 et 47. La densité numérique des dépôts situés au centre était inférieure (tons froids) à la densité des dépôts stellaires répartis en périphérie (tons chauds).

Figure 14 tirée de Thierry et al., 2019.

affectés (parmi les 6 cas présentant des distributions périphériques, 5 correspondaient à des phases de Thal < 4). Les distributions centrales, ou centrales et périphériques, étaient en revanche observées préférentiellement dans les cas les plus avancés (parmi les 19 cas présentant

des distributions centrales ou centrales et périphériques, 14 correspondaient à des phases de Thal ≥ 4). La topographie de l'accumulation intraneuronale de Tau-p dans le noyau médial du corps mamillaire débute et prédomine latéralement près de l'arrivée du pilier du fornix. La sévérité de l'atteinte du noyau latéral contrastait avec les changements relativement modérés observés dans le noyau médial (**Figures 13b, 13d et 13f**). L'hétérogénéité de la distribution des accumulations extracellulaire d'A β et intraneuronale de Tau-p a été illustrée au moyen de cartes des densités locales des lésions, établies pour six cas présentant des degrés de gravité lésionnelle variés (**Figure 14**).

2. Caractérisation de la pathologie Tau axonale du pilier du fornix

2.1. Propriétés pathogéniques des espèces de Tau-p observées dans le pilier du fornix

La distribution de la pathologie Tau dans le système subiculo-fornico-mamillaire suggère une propagation axonale des agrégats de Tau-p des neurones du subiculum aux neurones du corps mamillaire, à travers le pilier du fornix. Pour valider cette hypothèse, nous

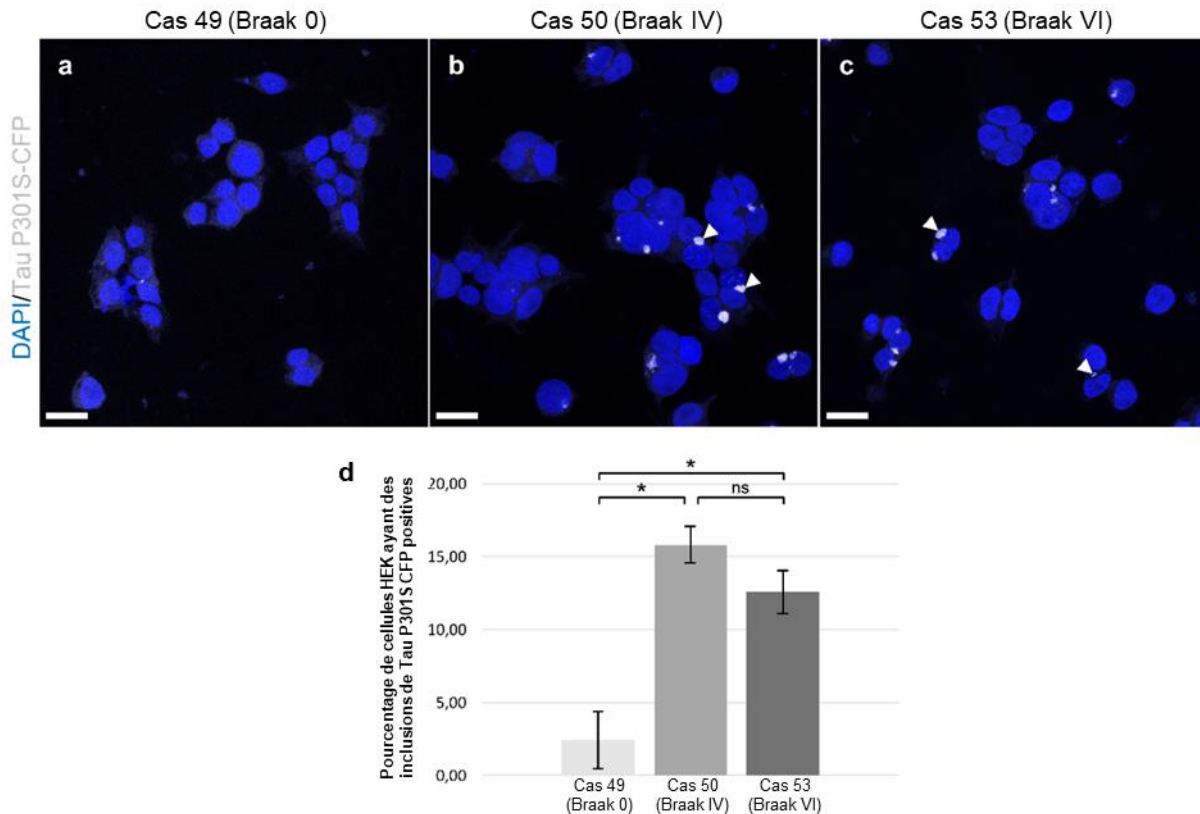


Figure 15 : Les homogénats de piliers du fornix prélevés sur des cerveaux de cas Alzheimer peuvent agir comme des propagons et induire l'agrégation de Tau *in vitro*. a-c) Les homogénats de pilier du fornix (10% en PBS, 3000 g, 5 min) ont été obtenus à partir d'échantillons congelés non fixés provenant d'un cas de contrôle (a, cas 49, Braak 0), d'un cas de sévérité intermédiaire (b, cas 50, Braak IV) et d'un cas évolué (c, cas 53, Braak VI). Des biosenseurs cellulaires de type HEK, capables de détecter spécifiquement la présence de protéines Tau pathogéniques, ont été incubés en présence de ces homogénats. Les cellules HEK ont développé des agrégats CFP positifs de protéines Tau P301S endogènes (pointes de flèches), lorsqu'elles ont été traitées par des homogénats provenant des cas 50 et 53 présentant une pathologie Tau axonale, mais pas lorsqu'elles ont été traitées par l'homogénat du cas de contrôle (cas 49). Images confocales représentatives, projections d'intensités maximales de 59 plans, signaux CFP et DAPI (barres d'échelle : 20 μ m). d) Pourcentage moyen de cellules HEK contenant des agrégats intracellulaires de Tau P301S-CFP dans chaque groupe, obtenu à partir de trois expériences indépendantes (test de Student, effectué après une transformation des données par $\arcsin(\sqrt{x})$ - appliquée aux proportions afin de se rapprocher d'une distribution gaussienne, n. s. : non significatif, * $p < 0,05$). Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne.

Figure 15 tirée de Thierry et al., 2019.

avons déterminé si les accumulations de Tau-p AT8 positives observées dans le pilier du fornix avaient des propriétés d'ensemencement en utilisant une lignée de cellules HEK Tau RD P301S. Comme nous l'avons vu, ces cellules expriment des protéines Tau humaines, porteuses de la mutation P301S et couplées à la CFP (Cyan Fluorescent Protein). Celles-ci s'agrègent au contact de protéines Tau mal conformées jouant le rôle d'amorces (« seeds »). Des homogénats de pilier du fornix, contenant des axones enrichis en protéines Tau-p AT8 positives, ont été lipofectés dans ces biosenseurs cellulaires où ils ont induit la formation de nombreuses inclusions intracellulaires de protéines Tau P301S CFP positives (**Figures 15b, 15c et 15d**), contrairement à l'homogénat issu d'un pilier du fornix de contrôle dépourvu de toute accumulation de protéines Tau-p AT8 positives (**Figures 15a et 15d**).

2.2. Caractérisation des propagons de Tau observés dans le pilier du fornix

2.2.1. Propriétés immunoréactives et argyrophiles de la pathologie Tau axonale

Pour identifier les espèces moléculaires de Tau pathogéniques observées dans le pilier du fornix, des immunohistochimies anti-Tau TG3, PHF1, Alz50, C3, ainsi qu'une imprégnation argentique de Gallyas, ont été réalisées dans un sous-ensemble de 19 cas comprenant quatre cas de contrôle (Braak 0/I/II), huit cas intermédiaires (Braak III/IV) et sept cas sévèrement affectés (Braak VI ; **Figures 16a à 16d**). La pathologie Tau axonale observée dans le groupe de cas intermédiaires (Braak III/IV) n'était constituée que d'axones tortueux AT8 et TG3 positifs, plus rarement et dans une moindre mesure PHF1 positifs. Des marquages axonaux ponctiformes peu nombreux Alz50 et C3 positifs ont été, de plus, observés dans les cas sévères (respectivement 6 et 5 cas sur 7 cas sévères). Seuls deux cas sévères présentaient quelques rares axones tortueux argyrophiles, marqués après une imprégnation argentique de Gallyas (**Figure 17**). Les propriétés de nucléation de la pathologie Tau du pilier du fornix ayant été mises en évidence dès le stade de sévérité intermédiaire où seuls des axones AT8, TG3 et PHF1 positifs ont été observés, nous avons conclu que cette activité pathogénique ne dépendait pas de la présence de protéines Tau mal repliées selon la conformation reconnue par l'anticorps Alz50 (axones Alz50 négatifs), fibrillaires ou tronquées (axones Gallyas et C3 négatifs).

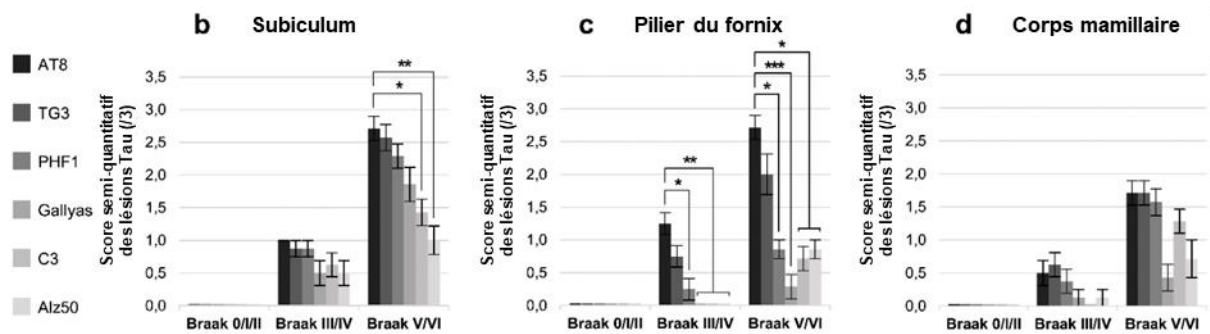
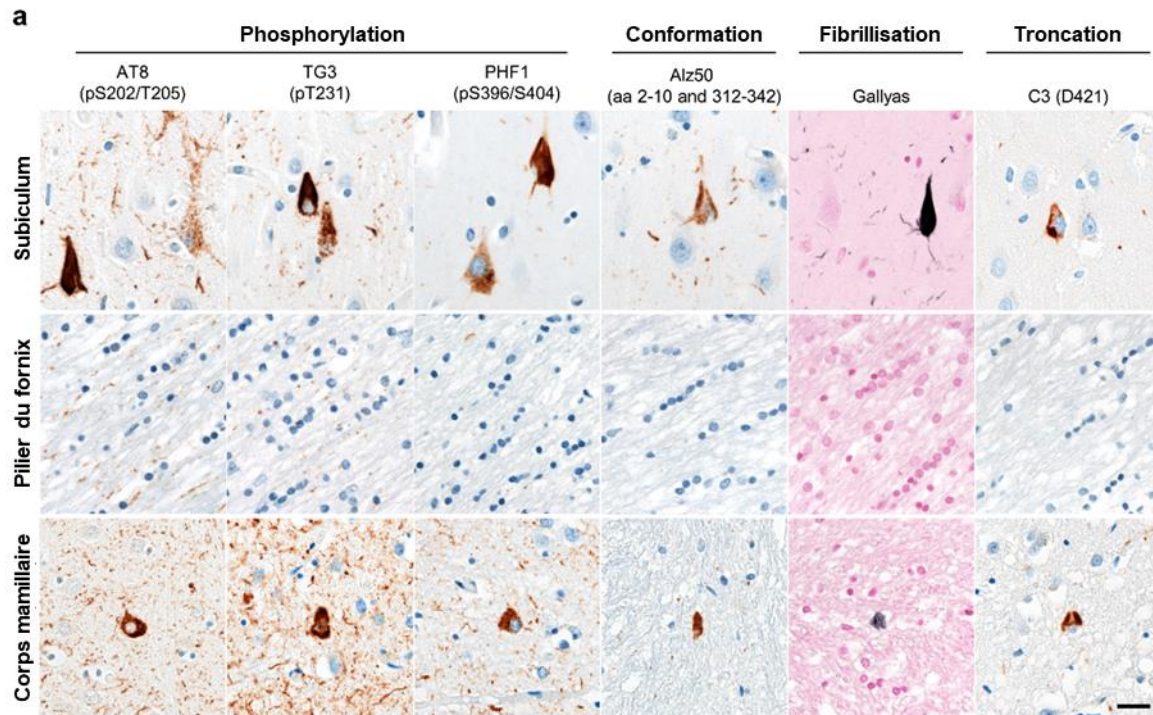


Figure 16 : Les axones du pilier du fornix contiennent des protéines Tau anormalement phosphorylées mais non fibrillaires. a) Pathologie Tau observée dans le subiculum, pilier du fornix et corps mamillaire (lignes) après immunohistochimie, dirigée contre les formes de Tau anormalement phosphorylées (AT8, TG3, PHF1), mal repliées (Alz50) ou tronquées (C3), ou imprégnation argentique de Gallyas, révélant la présence de Tau fibrillaires (colonnes ; barre d'échelle : 20 μ m). b-d) Densités numériques moyennes (scores semi-quantitatifs) des lésions Tau évaluées dans un sous-ensemble de 19 cas de stades de Braak variés après immunomarquage (AT8, TG3, PHF1, C3, Alz50) ou imprégnation argentique de Gallyas dans le subiculum (b), pilier du fornix (c) et corps mamillaire (d). Test de Friedman et post-test de Dunn en comparaison avec les valeurs obtenues après le marquage anti-Tau-p AT8, correspondant au groupe de référence : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Barres d'erreur : erreur standard de la moyenne.

Figure 16 tirée de Thierry et al., 2019.

2.2.2. Analyse en microscopie électronique de la pathologie Tau axonale

Des PHF étaient fréquemment observés en microscopie électronique dans les prélèvements de subiculum. Ils étaient absents dans les axones des piliers du fornix issus du

	Cas	AT8	TG3	PHF1	Alz50	C3	Gallyas
Contrôle	01	-	-	-	-	-	-
	04	-	-	-	-	-	-
	06	-	-	-	-	-	-
	07	-	-	-	-	-	-
Intermédiaires	10	+	-	-	-	-	-
	18	+	-	-	-	-	-
	14	+	+	-	-	-	-
	21	+	+	-	-	-	-
	22	+	+	-	-	-	-
	23	+	+	-	-	-	-
	19	+	+	+	-	-	-
Sévères	28	+	+	+	-	-	-
	40	+	+	+	-	-	-
	43	+	+	-	+/-	+/-	-
	47	+	+	+	+	-	-
	38	+	+	+	+	+	-
	46	+	+	+	+	+	-
	44	+	+	+/-	+/-	+/-	+
	45	+	+	+	+	+/-	+

Figure 17 : Marquages de la pathologie Tau axonale dans le pilier du fornix. Le sous-ensemble de 19 cas de stades de Braak variés est classé dans ce tableau selon l'absence (-, gris clair) ou la présence (+, gris foncé) de lésions Tau dans le pilier du fornix, détectées par immunohistochimie (anti-Tau AT8, TG3, PHF1, Alz50, C3) ou par imprégnation argentique de Gallyas. Les immunomarquages anti-Tau Alz50 et anti-Tau C3 étaient discrets et ponctiformes (parfois très rares et alors représentés par « +/- »). Le groupe de contrôle correspond aux cas de stades 0, I ou II de Braak, le groupe intermédiaire, aux stades III ou IV de Braak et le groupe sévère aux stades V ou VI de Braak.

Figure 17 tirée de Thierry et al., 2019.

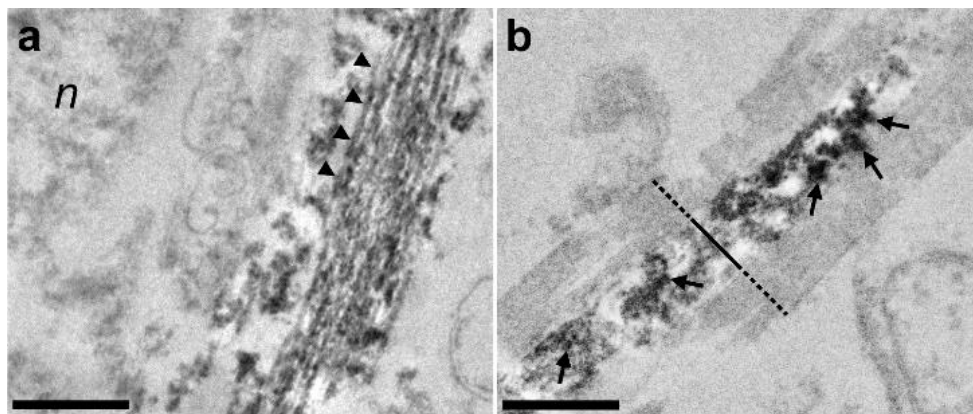


Figure 18 : Absence de PHF dans les accumulations de Tau anormalement phosphorylées du pilier du fornix. a-b) Précipités de diaminobenzidine denses aux électrons, observés en microscopie électronique après immunohistochimie anti-Tau-p AT8 dans le subiculum (a) ou le pilier du fornix (b) d'un cas de Braak VI, Thal 5 (barre d'échelle : 500 nm). a) Observation de PHF, Tau-p AT8 positifs, dans le périkyon d'un neurone du subiculum (têtes de flèches). n : noyau. b) Accumulations de Tau-p AT8 positives (flèches) dans un axone du pilier du fornix, dépourvues de PHF. Le matériel immunoréactif à l'AT8 était localisé dans l'axoplasme (ligne continue) et non dans la gaine de myéline (ligne pointillée). Nous n'avons pas pu identifier les composants du cytosquelette ou les organites subcellulaires associés aux accumulations de Tau axonales.

Figure 18 tirée de Thierry et al., 2019.

même cas (**Figures 18a et 18b**). Les agrégats de Tau étaient localisés dans l'axoplasme des axones (et non dans la gaine de myéline). Les précipités de DAB, denses aux électrons, n'ont pas permis d'identifier les structures du cytosquelette ou les organites de transport spécifiques (**Figure 18b**). Nous avons conclu, en accord avec les données immunohistochimiques obtenues dans le visible, que la pathologie Tau axonale était principalement constituée d'agrégats de protéines Tau-p non fibrillaires, dépourvus de PHF. Ces espèces moléculaires axonales étaient capables d'ensemencer la pathologie Tau dans les biosenseurs cellulaires dès le stade intermédiaire, malgré l'absence de PHF.

3. Relations hiérarchiques et topographiques des pathologies A β et Tau

3.1. Relations hiérarchiques

Nos résultats sont en faveur d'une propagation de la pathologie Tau-p dans le système subiculo-fornico-mamillaire à travers les axones du pilier du fornix. Aucune preuve d'un transport axonal de la pathologie A β n'a, en revanche, pu être établie. Nous nous sommes demandé s'il existait une relation hiérarchique entre les pathologies Tau et A β parmi les cas de la cohorte. Aucun ordre hiérarchique constant ne permettait de soupçonner un rapport de cause à effet entre les DNF ou les axones tortueux Tau-p positifs et les dépôts d'A β (**Figure 19**) : c'était le plus souvent la pathologie Tau qui était initiale, mais la pathologie A β l'était dans

Cas	Sub. Tau	Sub. A β	For. Tau	For. A β	Mam. Tau	Mam. A β
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-
07	-	-	-	-	-	-
05	-	+	-	-	-	+
24	+	-	-	-	-	-
11	+	-	+	-	-	-
13	+	-	+	-	-	-
16	+	-	+	-	-	-
19	+	-	+	-	-	-
20	+	-	+	-	-	-
21	+	-	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-
09	+	+	+	-	-	+
23	+	+	+	-	-	+
29	+	+	+	-	-	+
37	+	+	+	-	-	+
18	+	-	+	-	+	-
28	+	-	+	-	+	-
10	+	+	+	-	+	-
17	+	+	+	-	+	+
22	+	+	+	-	+	+
25	+	+	+	-	+	+
26	+	+	+	-	+	+
30	+	+	+	-	+	+
31	+	+	+	-	+	+
32	+	+	+	-	+	+
33	+	+	+	-	+	+
34	+	+	+	-	+	+
36	+	+	+	-	+	+
38	+	+	+	-	+	+
39	+	+	+	-	+	+
40	+	+	+	-	+	+
41	+	+	+	-	+	+
42	+	+	+	-	+	+
43	+	+	+	-	+	+
44	+	+	+	-	+	+
45	+	+	+	-	+	+
46	+	+	+	-	+	+
47	+	+	+	-	+	+
03	-	-	-	-	/	/
08	-	-	-	-	/	/
15	+	-	+	-	/	/
12	+	+	+	-	/	/
27	+	+	+	-	/	/
35	+	+	+	-	/	/

Figure 19 : Aucune relation hiérarchique n'a pu être observée entre la distribution des pathologies Tau et A β . Cas listés en fonction de l'absence (-, gris clair) ou de la présence (+, gris foncé) de lésions Tau ou A β dans le subiculum (Sub. Tau ou Sub. A β), le pilier du fornix (For. Tau ou For. A β) et le corps mamillaire (Mam. Tau ou Mam. A β). NB : Six corps mamillaires n'ont pas pu être prélevés ; les six cas correspondants ont été exclus de cette analyse de distributions hiérarchiques (en gris, fin du tableau).

Figure 19 tirée de Thierry et al., 2019.

quelques cas. Dix des 16 cas dépourvus de dépôts d'A β dans le corps mamillaire présentaient des axones tortueux dans le pilier du fornix, tandis qu'un seul des 25 cas ayant des dépôts d'A β dans le corps mamillaire n'avait pas d'axones tortueux dans le pilier du fornix (cas 05 ; **Figure 19**). Dans ce cas, quelques axones Tau-p AT8 positifs ont toutefois été observés dans le corps mamillaire, dans une zone proche de l'hypothalamus.

Il existait pourtant de fortes corrélations entre les densités de pathologies Tau et A β dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire, les plus significatives impliquant la densité numérique des DNF dans le subiculum (ou d'axones tortueux dans le pilier du fornix) et la densité volumique de dépôts d'A β dans le corps mamillaire (**Tableau 3**) :

- DNF dans le subiculum vs dépôts d'A β dans le corps mamillaire
(Test de Spearman, $\rho_S = 0,721$, $p < 0,0001$)
- Axones tortueux dans le pilier du fornix vs dépôts d'A β dans le corps mamillaire
(Test de Spearman, $\rho_S = 0,718$, $p < 0,0001$).

ρ_S (<i>p-value</i>)	Tau (AT8) Subiculum	Tau (AT8) Pilier du fornix	Tau (AT8) Corps mamillaire
A β (6F/3D) Subiculum	0,6752 ($p < 0,0001$)	0,5975 ($p < 0,0001$)	0,6080 ($p < 0,0001$)
A β (6F/3D) Pilier du fornix	N/A	N/A	N/A
A β (6F/3D) Corps mamillaire	0.7214 ($p < 0,0001$)	0.7183 ($p < 0,0001$)	0.5631 ($p < 0,001$)

Tableau 3 : Matrice de corrélations de Spearman. Ensemble des coefficients de corrélation de Spearman (ρ_S), obtenus entre les densités numériques des agrégats de Tau et les densités volumiques des dépôts d'A β dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire.

3.2. Relations topographiques

La technique de microcryodissection a permis de dissocier *in situ* les axones provenant du pilier du fornix et pénétrant dans le corps mamillaire (**Figure 20a**). Certaines de ces terminaisons axonales dissociées étaient emplies de matériel Tau-p AT8 positif (**Figure 20b**). Des dépôts focaux d'A β microcryodisséqués ont été observés au contact d'axones tortueux Tau-p AT8 positifs dans le corps mamillaire, à proximité de l'arrivée du pilier du fornix (**Figure 20c**).

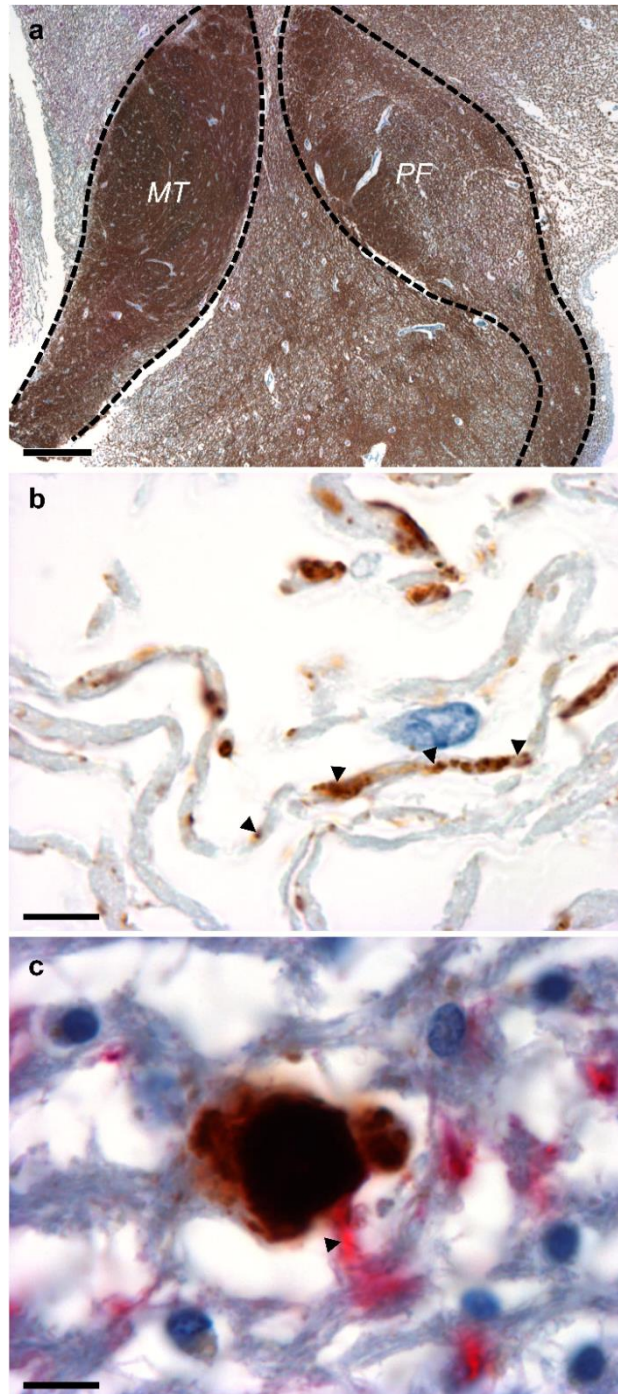


Figure 20 : Axones tortueux au contact de dépôts d'Aβ dans un corps mamillaire microcryodisséqué. a) Coupe coronale d'un corps mamillaire après microcryodisséction, issu d'un cas *post-mortem* de Braak VI, Thal 5. Aspect préservé du tissu à faible grossissement. Immunohistochimie anti-MBP/NF (protéine basique de la myéline - MBP - en brun, neurofilament - NF - en rouge). PF : arrivée du pilier du fornix. MT : départ du faisceau mamillo-thalamique (barre d'échelle : 400 μ m). b) Axone du pilier du fornix isolé et empli de matériel Tau-p AT8 positif (têtes de flèches), observé dans le corps mamillaire après microcryodisséction. Immunohistochimie anti-Tau-p AT8 (barre d'échelle : 8 μ m). c) Dépôt focal d'Aβ microcryodisséqué au contact d'un axone tortueux Tau-p AT8 positif (têtes de flèches) dans le corps mamillaire, à proximité de l'arrivée du pilier du fornix. Immunohistochimie anti-Aβ 6F3D/Tau-p AT8 (Aβ en brun, Tau en rouge, échelle : 8 μ m).

Figure 20 tirée de Thierry et al., 2019.

La technique de CLARITY a apporté un aperçu tridimensionnel des différents types de dépôts d'A β observés dans le corps mamillaire. Ils pouvaient être diffus, stellaires, ou parfois neuritiques (**Figures 21a et 21b**). Des neurites enrichis en protéines Tau étaient enchevêtrés dans les dépôts diffus d'A β , mais étaient repoussés hors du cœur amyloïde. Ils étaient parfois en contact avec du matériel A β positif. Ces dépôts ont été observés dans les parties latérales et périphériques du corps mamillaire, près de l'arrivée du pilier du fornix (**Figure 21c**).

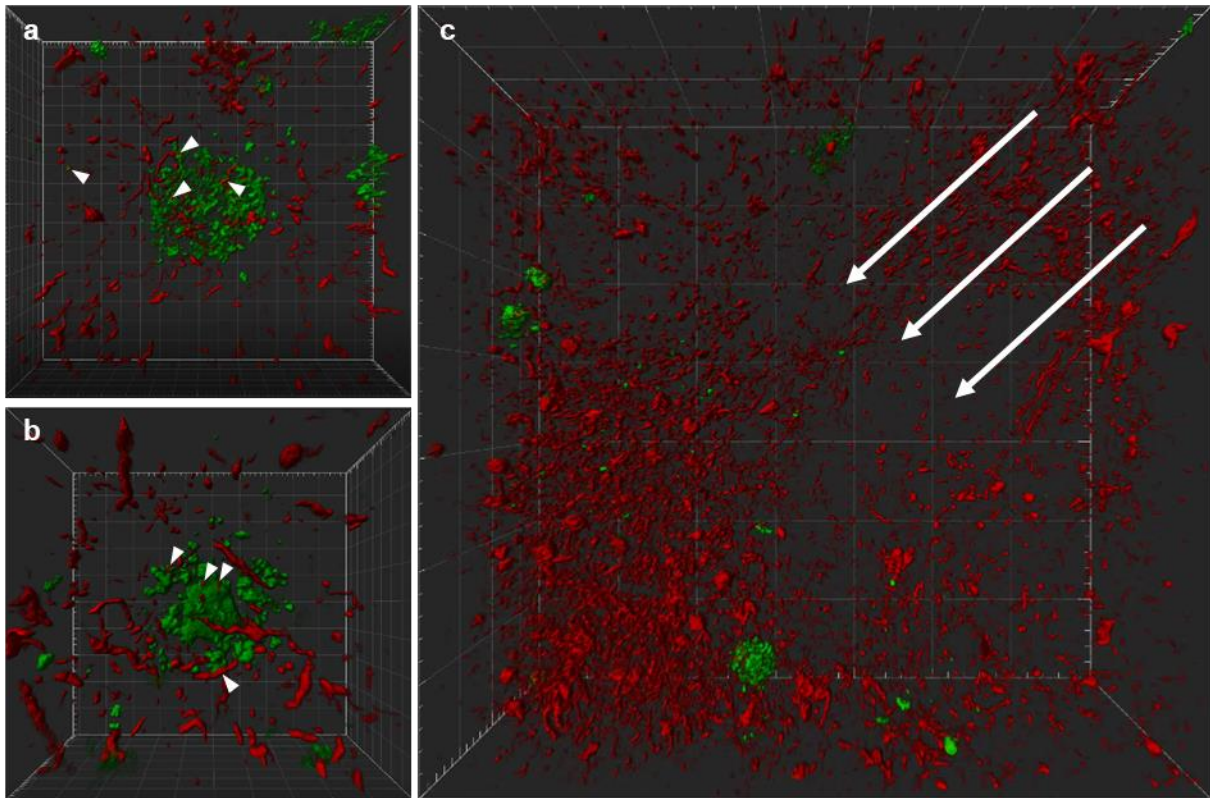


Figure 21 : Aperçu tridimensionnel des pathologies Tau et A β dans un corps mamillaire clarifié par CLARITY. Cerveau humain. Corps mamillaire issu d'un cas *post-mortem* de Braak VI, Thal 5. Immunohistochimie anti-A β 4G8/Tau B19, A β en vert (Alexa 488), Tau en rouge (Alexa 555). a) Vue d'ensemble de l'arrivée du pilier du fornix (flèches) dans le corps mamillaire, où les pathologies Tau et A β convergent. Repère : 1 unité = 100 μ m. b-c) Dans le corps mamillaire, différents types de dépôts d'A β ont été observés, à proximité de neurites enrichis en protéines Tau, parfois au contact d'agrégats de peptides A β (têtes de flèches). b) Dépôt d'A β diffus. c) Dépôt d'A β neuritique comportant en son centre un cœur dense. Repère : 1 unité = 10 μ m.

Figure 21 tirée de Thierry et al., 2019 ; images extraites de vidéos accessibles en ligne.

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00401-019-02108-7#SupplementaryMaterial>

4. Relation entre la pathologie Tau axonale et l'accumulation d'A β

4.1. Conséquences de la pathologie Tau sur les axones du pilier du fornix

Un double-marquage anti-protéine basique de la myéline (MBP) et anti-neurofilament a été réalisé afin de révéler la morphologie axonale dans le pilier du fornix. Des sphéroïdes axonaux neurofilament positifs, de diamètres variables, ont été observés ; ils indiquent un déficit du transport ayant lieu dans l'axone, premier stade de sa dégénérescence. Des axones MBP négatifs et neurofilament positifs, signes d'une démyélinisation, ont également été

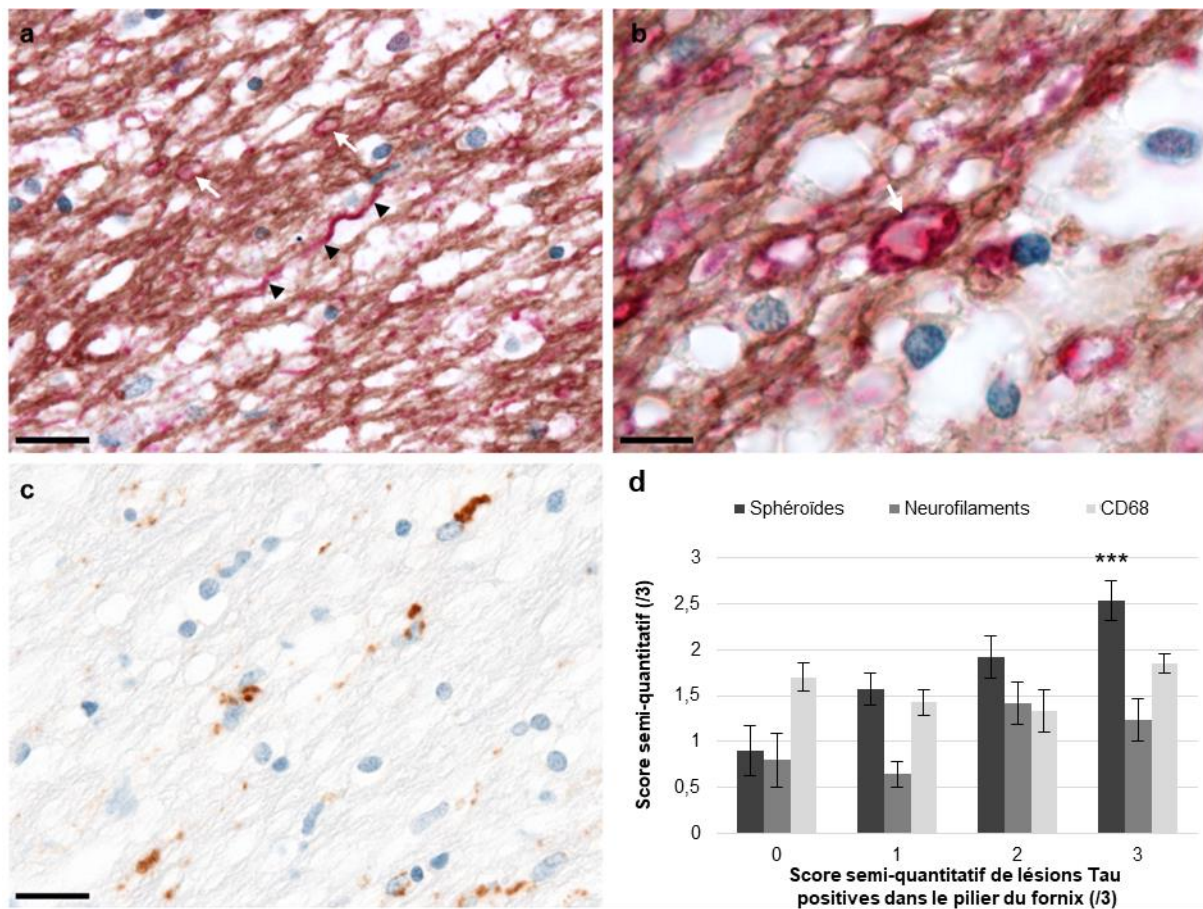


Figure 22 : La pathologie Tau dans le pilier du fornix est associée à une dégénérescence axonale. a) Sphéroïdes axonaux (flèches blanches) et axones démyélinisés neurofilament positifs (têtes de flèches noires) dans le pilier du fornix. Immunohistochimie anti-MBP/NF (MBP en brun, NF en rouge. Barre d'échelle : 20 μ m. b) Sphéroïde axonal observé à plus fort grossissement (flèche blanche). Barre d'échelle : 8 μ m. c) Cellules phagocytaires dans le pilier du fornix. Immunohistochimie anti-CD68. Barre d'échelle : 20 μ m. d) Moyennes des densités numériques de sphéroïdes axonaux, d'axones démyélinisés et de cellules phagocytaires CD68 positives dans le pilier du fornix, en fonction de la sévérité de la pathologie Tau axonale. Evaluations semi-quantitatives réalisées sur une échelle de 0 à 3. Test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn, *** $p < 0,001$; comparaison avec le groupe de contrôle (absence de pathologie Tau dans le pilier du fornix, grade 0). Barre d'erreur : erreur standard de la moyenne.

évalués. La densité numérique des sphéroïdes était associée à la sévérité de la pathologie Tau axonale (test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn, $p < 0,05$ pour un grade 2 de lésions Tau dans le pilier du fornix, $p < 0,001$ pour un grade 3 de lésions Tau dans le pilier du fornix, **Figures 22a, 22b et 22d**). Les densités numériques des sphéroïdes axonaux et des axones tortueux étaient corrélées dans le pilier du fornix (test de Spearman, $\rho_S = 0,602$, $p < 0,0001$). Quelques axones neurofilament positifs dépourvus de gaine de myéline ont été observés. Leur densité était également, quoique légèrement, corrélée avec la densité des axones tortueux (test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn, $p > 0,05$; test de Spearman, $\rho_S = 0,293$, $p < 0,05$, **Figures 22a et 22d**). La densité de cellules CD68 positives présentant une activité phagocytaire a été évaluée dans le pilier du fornix. Aucun lien statistique avec la densité numérique d'axones Tau-p positifs n'a été mis en évidence (test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn, $p > 0,05$; test Spearman, $p > 0,05$, **Figures 22c et 22d**).

4.2. Pathologie axonale et accumulation d'APP dans le corps mamillaire

Les accumulations axonales d'APP étaient peu fréquentes dans le pilier du fornix ; seuls 9 cas intermédiaires sur 20 et 6 cas évolués sur 19 présentaient quelques axones enrichis en APP. Cette faible fréquence peut être due au caractère transitoire de l'accumulation d'APP secondaire à un dommage axonal. L'accumulation d'APP intéressant aussi les terminaisons axonales, nous l'avons recherchée dans le corps mamillaire. Trois types d'immunoréactivité à l'APP y ont été identifiés et quantifiés de façon semi-quantitative : 1) des plaques synaptiques, constituées de regroupements de marquages ponctiformes de petite taille, 2) des neurites isolés et 3) des plaques dystrophiques, formées de couronne de neurites APP positifs associés aux dépôts d'A β (**Figures 23a à 23c**). Ces différents types d'accumulation d'APP dans le corps mamillaire étaient liés à la sévérité de la pathologie Tau dans le pilier du fornix. Le nombre de neurites isolés et de plaques dystrophiques dans le corps mamillaire augmentaient avec la sévérité de la pathologie Tau dans le pilier du fornix (test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn, $p < 0,05$ entre les grades 0 (moyenne des scores semi-quantitatifs allant de 0 à 3 \pm erreur-type : 0 ± 0) et 3 ($1,25 \pm 0,35$) d'axones tortueux dans le pilier du fornix (neurites isolés) et $p < 0,001$ entre les grades 0 ($0,14 \pm 0,14$) et 3 ($2,25 \pm 0,28$) d'axones tortueux dans le pilier du fornix (plaques dystrophiques)). Les plaques synaptiques tendaient à être plus abondantes dans le corps mamillaire des cas présentant une pathologie Tau modérée dans le pilier du fornix. Leur densité n'augmentait pas avec la sévérité de la pathologie Tau axonale (**Figure 23d** ; test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn, $p > 0,05$).

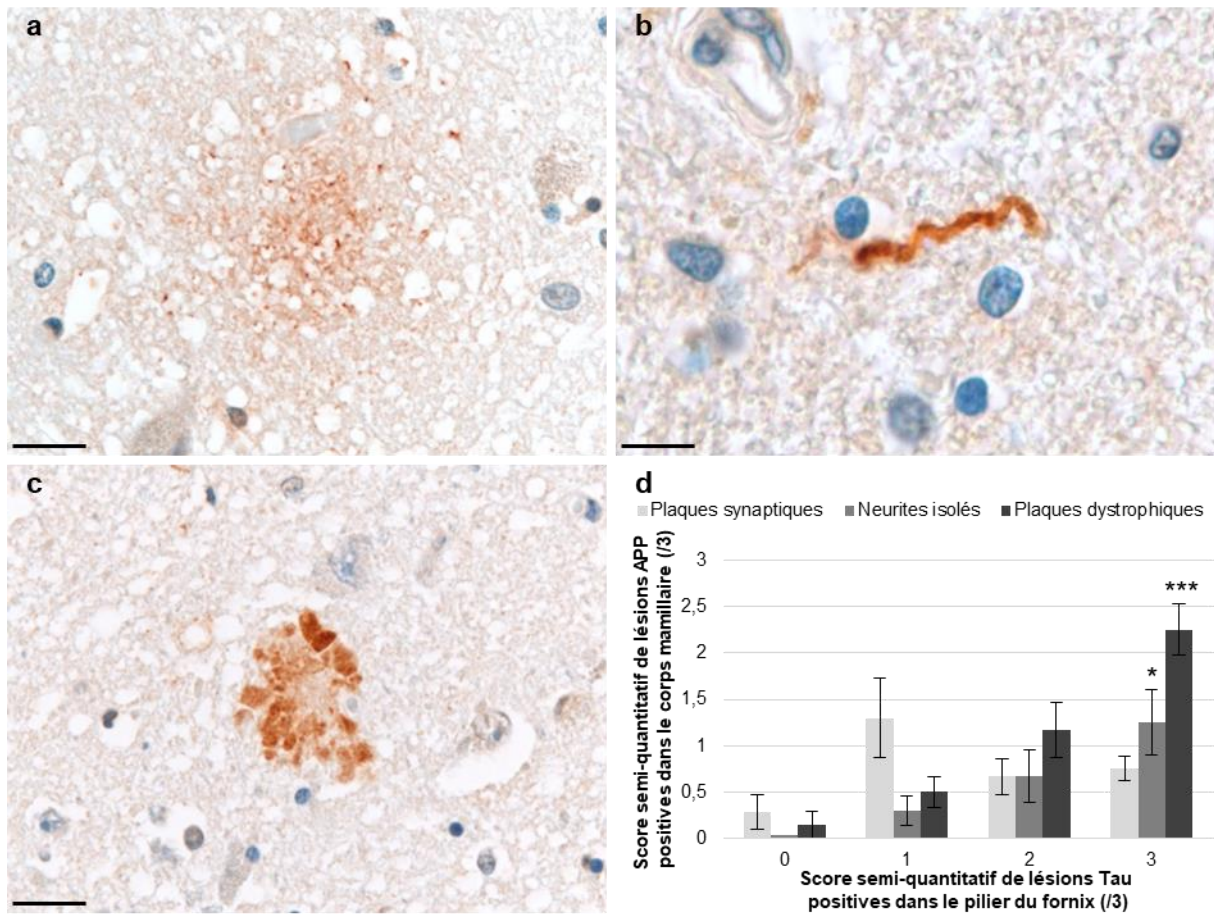


Figure 23 : La pathologie Tau dans le pilier du fornix est associée à l'accumulation d'APP dans le corps mamillaire. a-c) Différents types d'accumulations d'APP ont été observés après immunohistochimie anti-APP 22C11 dans le corps mamillaire : a) plaque dite « synaptique », b) neurite isolé, c) plaque dystrophique. Barres d'échelle : 20 μ m (a, c) ou 8 μ m (b). d) Moyennes des densités numériques de plaques synaptiques, neurites isolés et plaques dystrophiques dans le corps mamillaire, en fonction de la sévérité de la pathologie Tau axonale dans le pilier du fornix. Evaluations semi-quantitatives réalisées sur une échelle de 0 à 3. Test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunn, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; comparaison avec le groupe de contrôle (absence de pathologie Tau dans le pilier du fornix, grade 0). Barre d'erreur : erreur standard de la moyenne.

Discussion

1. Distribution des pathologies A β et Tau dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire

Nous avons retracé la progression « moyenne » des pathologies A β et Tau dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire chez l'Homme, en analysant la distribution des accumulations d'A β et de Tau-p dans 47 cas de stades de Braak et de phases de Thal variés (**Figure 24**).

1.1. L'A β s'accumule dans le subiculum puis le corps mamillaire, mais épargne le pilier du fornix

La distribution de l'A β dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire au sein de la cohorte est compatible avec une progression du subiculum au corps mamillaire (comme suggéré dans Thal et al., 2002b). Cependant, nous n'avons trouvé aucune preuve histologique ou biochimique en faveur d'un transport d'A β par le pilier du fornix. Dans le corps mamillaire, les dépôts d'A β tendaient à se former d'abord en périphérie du noyau mamillaire médial, en bordure des afférences du pilier du fornix et des efférences mamillo-thalamiques, avant d'intéresser sa partie centrale. L'accumulation d'A β ne se déployait pas selon un gradient partant de la partie latérale du noyau mamillaire médial proche de l'arrivée du pilier du fornix. Il a été souligné à plusieurs reprises que la progression de la pathologie A β n'était pas seulement associée aux connexions, mais pouvait être en partie expliquée par une diffusion du peptide dans l'espace extracellulaire ou à travers la membrane basale des vaisseaux sanguins (Eisele et Duyckaerts, 2016) : chez l'Homme, des dépôts d'A β se sont développés dans un fragment de cortex déconnecté d'un patient atteint de MA (Duyckaerts et al., 1997) ; la transmission de la pathologie A β peut se produire par greffe durale contaminée (Frontzek et al., 2016; Hervé et al., 2018; Iwasaki et al., 2018; Kovacs et al., 2016b), ou par injection d'hormones de croissance d'origine cadavérique contaminées (Cali et al., 2018; Duyckaerts et al., 2018; Jaunmuktane et al., 2015; Purro et al., 2018). La survenue d'une angiopathie amyloïde chez des sujets jeunes, ayant subi une opération neurochirurgicale des décennies auparavant, suggère une transmission par des instruments contaminés comme ce qui a été observé dans les maladies à prions (Giaccone et al., 2019; Jaunmuktane et al., 2018). Chez les souris transgéniques surexprimant l'APP humaine mutée, des dépôts intracérébraux d'A β peuvent se développer après injection intrapéritonéale d'extraits de cerveau contenant de l'A β (Eisele et al., 2010). Parce que le corps mamillaire n'est pas contigu au subiculum, la diffusion passive à travers le système subiculo-mamillaire est toutefois peu probable. L'origine des dépôts d'A β dans le corps mamillaire reste

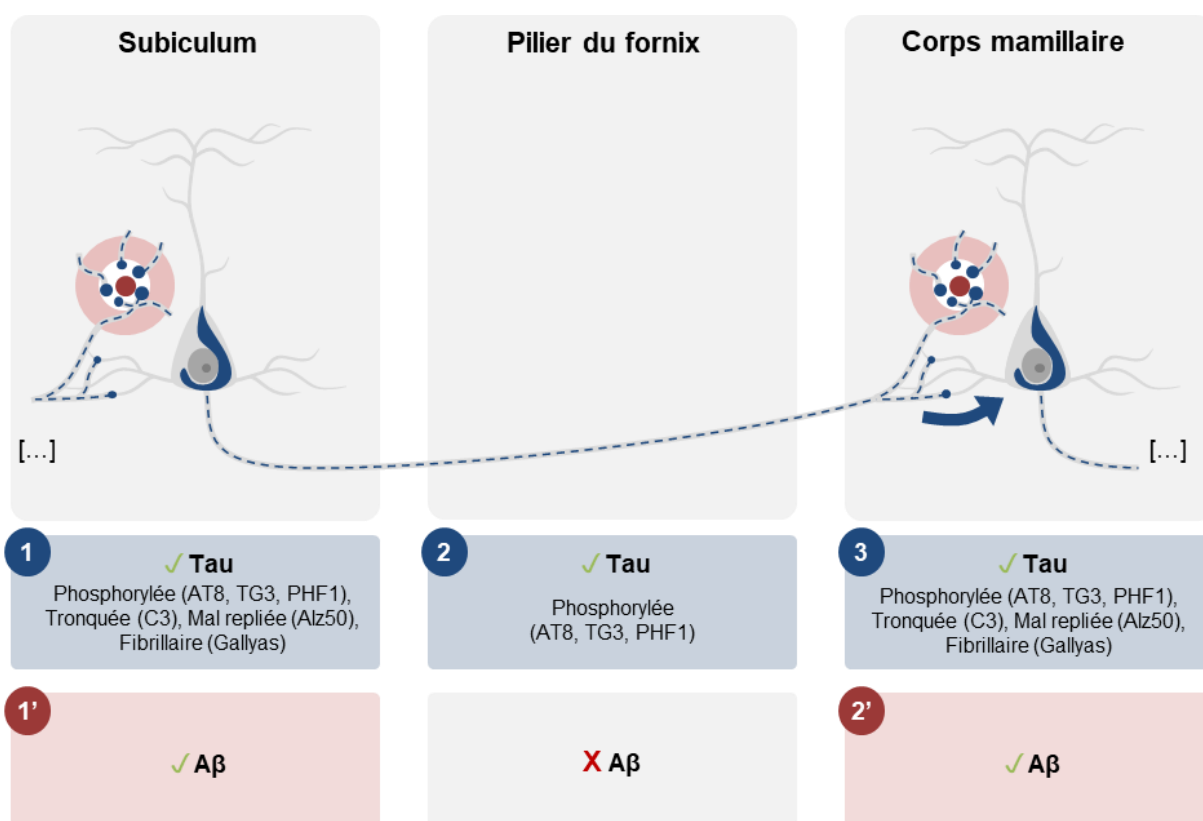


Figure 24 : Synthèse des résultats. Dans le système subiculo-fornico-mamillaire, la pathologie Tau affectait d'abord le corps cellulaire des neurones du subiculum, puis leurs axones situés dans le pilier du fornix. Seul un sous-ensemble des espèces de Tau observées dans le corps cellulaire des neurones du subiculum (AT8, TG3, PHF1, C3, Alz50 et Gallyas positives) constituait les axones tortueux observés dans le pilier du fornix (AT8, TG3, PHF1). Ces accumulations axonales de Tau, anormalement phosphorylées mais non fibrillaires, correspondaient à des propagons capables d'induire l'agrégation de Tau *in vitro*. Ces propagons étaient transportés par les axones du pilier du fornix pour contaminer secondairement le corps cellulaire des neurones du corps mamillaire, qui reproduisaient le profil complet des espèces de Tau observées dans le subiculum. La pathologie Aβ apparaissait d'abord dans le subiculum, puis dans le corps mamillaire. Aucune accumulation d'Aβ n'a en revanche été détectée dans le pilier du fornix. Dans ce système, l'agrégation de Tau ou l'accumulation d'Aβ pouvait chacune être initiale. Les deux pathologies étaient toutefois corrélées et intimement associées, en particulier la pathologie Tau du pilier du fornix – associée à la dégénérescence des axones – et la pathologie Aβ du corps mamillaire. Nos données sont incompatibles avec une relation de cause à effet entre les composantes Tau et Aβ mais évoquent une relation de synergie entre ces pathologies, après avoir été indépendamment initiées. L'interaction de ces composantes a probablement lieu au niveau de la plaque sénile, où convergent les lésions Tau et Aβ. Les éléments associés à la pathologie Aβ sont représentés en rouge, ceux se référant à la pathologie Tau sont indiqués en bleu.

donc évasive, bien que leur topographie semble influencée par les axones du pilier du fornix. Des données obtenues *in vitro* ont suggéré une interaction entre les agrégats d' α -synucléine et d'Aβ (Ono et al., 2012) ; nous n'avons cependant constaté aucune influence de la pathologie α -synucléine sur l'accumulation d'Aβ dans le système subiculo-fornico-mamillaire.

1.2. La pathologie Tau progresse de façon antérograde dans le système subiculo-fornico-mamillaire

Les agrégats de Tau-p apparaissaient d'abord dans le subiculum, puis dans les axones du pilier du fornix, l'une de ses principales voies efférentes, et enfin dans le corps mamillaire, où elle se termine. La présence d'axones Tau-p AT8 positifs dans le pilier du fornix a déjà été décrite (Plowey et Ziskin, 2016) ; nous avons toutefois approfondi l'analyse de Plowey et Ziskin en étudiant le pilier du fornix parallèlement à sa longueur, afin d'obtenir un meilleur aperçu des axones tortueux Tau-p positifs qui se sont avérés être fins et fragmentés. Dans le corps mamillaire, les accumulations de Tau-p intraneuronales étaient d'abord observées dans la partie latérale du noyau mamillaire médial localisé à proximité de l'arrivée du pilier du fornix, où elles étaient plus abondantes chez les cas présentant une MA plus avancée. Plowey et Ziskin ont également mentionné la présence d'astrocytes Tau-p AT8 positifs dans le corps mamillaire. Nous n'avons pas inclus ces astrocytes dans notre analyse en les assimilant, comme les auteurs l'ont fait, à une astroglie Tau liée au vieillissement (ARTAG ; Kovacs et al., 2016a). En dépit d'interactions observées *in vitro* entre les agrégats de Tau et d' α -synucléine (Guo et al., 2013), nous n'avons trouvé aucune influence de la pathologie α -synucléine sur la progression de la pathologie Tau dans le système subiculo-fornico-mamillaire. Ces données témoignent d'une hiérarchie des régions affectées par la pathologie Tau, compatible avec l'hypothèse d'une propagation axonale antérograde des lésions suggérée par les données expérimentales issues de modèles *in vitro* et *in vivo*, dans lesquels la pathologie Tau est transmise de neurone en neurone par le biais de connexions neuronales (Calafate et al., 2015; Clavaguera et al., 2009; Guo et al., 2016; Iba et al., 2015; Takeda et al., 2015; Tardivel et al., 2016; Wang et al., 2017).

2. Caractérisation de la pathologie Tau axonale dans le pilier du fornix

2.1. Les axones du pilier du fornix transportent des propagons Tau

Des homogénats de pilier du fornix contenant des axones enrichis en Tau-p ont initié l'agrégation de Tau P301S surexprimée dans une lignée de cellules HEK non neuronales, utilisée en tant que biosenseur cellulaire. Cette propriété « d'ensemencement » des lésions n'était identifiée que si les extraits de pilier du fornix étaient issus de cas de MA intermédiaire (Braak IV) ou sévère (Braak VI). Dans les axones du pilier du fornix, aucun organe subcellulaire n'a pu être observé au contact des agrégats de Tau-p AT8 positifs en microscopie électronique. Bien que la qualité des tissus soit insuffisante pour conclure de façon définitive,

ces observations soulèvent la possibilité d'une propagation des agrégats de Tau-p de proche en proche dans le cytosol axonal. Le mécanisme de transfert des propagons Tau d'un neurone à l'autre reste à élucider chez l'Homme. Il peut impliquer simultanément plusieurs modalités décrites en conditions expérimentales. Les propagons sont probablement libérés directement dans le milieu extracellulaire ou sécrétés dans des vésicules exosomales ou ectosomales. Leur internalisation mettrait en jeu des mécanismes d'absorption à la membrane dépendante de récepteurs membranaires, de fusion des vésicules extracellulaires ou d'endocytose et de macropinocytose. Des nanotubes peuvent également assurer le transfert inter-neuronal de propagons (Colin et al., 2020).

2.2. Les propagons Tau transportés par le pilier du fornix ne sont pas fibrillaires

Nous avons tiré profit du caractère isolé et exclusivement axonal du pilier du fornix pour caractériser les propagons Tau transportés par les axones. L'activité d'ensemencement des axones du pilier du fornix Tau-p AT8 positifs était détectée dès le stade de MA intermédiaire et ne nécessitait pas la présence de Tau tronquée (marquage C3 négatif), mal repliée selon la conformation reconnue par l'anticorps Alz50 (marquage Alz50 négatif) ou fibrillaire (Gallyas négatif et absence de PHF en microscopie électronique). Elle était associée à une concentration élevée de Tau phosphorylée, principalement aux sites Ser202/Thr205 et Thr231/Ser235 (marquages AT8 et TG3 positifs). Nos données suggèrent que les axones du pilier du fornix, qui ne contenaient qu'un sous-ensemble des espèces de Tau AT8, TG3, PHF, Alz50, C3 et Gallyas positives détectées dans le soma des neurones du subiculum dont ils provenaient, pouvaient transmettre la pathologie Tau aux neurones du corps mamillaire qui acquéraient secondairement le même profil de marquage complet que celui observé dans le subiculum. Une séquence de modifications post-traductionnelles et de repliements de Tau au cours de la pathologie a été proposée : Tau est d'abord phosphorylée au niveau des sites Thr231/Ser235 (TG3 positive), puis Ser202/Thr205 (AT8 positive), avant de se replier anormalement selon la conformation reconnue par l'anticorps Alz50. Le clivage en C-terminal de Tau au niveau du site Asp421 pourrait intervenir en parallèle de ces évènements, tous précoces et antérieurs à la formation de PHF (Luna-Muñoz et al., 2007). Nos données sont en accord avec ce scénario, bien que nos observations suggèrent que la phosphorylation des sites Ser202/Thr205 précède celle des sites Thr231/Ser235. Il a été démontré que la phosphorylation anormale de Tau augmente l'efficacité d'ensemencement et facilite la propagation de la pathologie (Hu et al., 2016). Des données récentes indiquent cependant que la conformation de la protéine Tau,

indépendamment de son état de phosphorylation, est cruciale (Mirbaha et al., 2018). La conformation anormale de Tau contenue dans les PHF de la MA (Falcon et al., 2018b; Fitzpatrick et al., 2017), similaire à celle de l'encéphalopathie traumatique chronique (Falcon et al., 2019) mais différente de celle observée dans les corps de Pick (Falcon et al., 2018a), ont chacune été décrites par cryo-microscopie électronique. Comme « l'ensemencement » n'était pas associé, dans notre étude, à la présence de PHF, on peut penser que ces derniers correspondent à un changement structural tardif. Des monomères mal repliés suffisent à induire l'ensemencement de la pathologie Tau (Mirbaha et al., 2018; Sharma et al., 2018) ; leur conformation n'a pas été complètement élucidée. Elle pourrait être similaire ou différente de la conformation des protéines Tau organisées en PHF. L'exposition des séquences (275)VQIINK(280) et (306)VQIVYK(311) observée dans les monomères pathogéniques est importante pour leur agrégation (Von Bergen et al., 2001, 2000; Mirbaha et al., 2018) et est probablement impliquée dans l'induction initiale de la pathologie. La conformation et le degré d'assemblage des propagons Tau natifs, mis en évidence dans les axones du pilier du fornix, restent à définir.

3. Relations hiérarchiques et topographiques entre les pathologies A β et Tau

Nous avons tenté de trouver un lien entre l'accumulation de l'A β et l'agrégation de Tau à partir de nos données obtenues dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire. Des corrélations ont été constatées entre les densités volumiques des dépôts d'A β et les densités numériques de lésions Tau évaluées dans le subiculum, le pilier du fornix et le corps mamillaire. Nous n'avons cependant pas pu établir de relations hiérarchiques entre ces pathologies. Les corrélations les plus fortes impliquaient les densités des lésions Tau du subiculum (ou du pilier du fornix) et la densité volumique des dépôts d'A β du corps mamillaire. La pathologie Tau axonale semblait, en moyenne, précéder l'accumulation d'A β dans le corps mamillaire : des axones tortueux ont été observés dans le pilier du fornix en l'absence de dépôts d'A β dans le corps mamillaire dans 10 cas, tandis qu'un seul cas présentait des dépôts A β dans le corps mamillaire sans pathologie Tau dans le pilier du fornix. Les dépôts d'A β dans le corps mamillaire survenaient dans la zone de projection des axones enrichis en Tau-p du pilier du fornix ; une interaction physique entre ces deux altérations a par ailleurs été mise en évidence par les méthodes de CLARITY et de microcryodissection. Nos observations menées dans le circuit subiculo-fornico-mamillaire suggèrent donc une relation étroite entre la pathologie Tau axonale et l'accumulation d'A β .

Une relation de cause à effet entre l'accumulation d'A β et les agrégats de Tau a été postulée par l'hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy et Higgins, 1992), puis recherchée sans succès (Braak et Del Tredici, 2013). L'agrégation de Tau n'a jamais été observée chez des souris tg *APP* ou tg *APPxPS1*, y compris chez des animaux exprimant la protéine Tau humanisée. De plus, nos données ne soutiennent pas cette hypothèse : des fibres axonales tortueuses enrichies en Tau-p issues du pilier du fornix ainsi que des DNF ont été observées dans le corps mamillaire en l'absence de dépôts d'A β . Braak et Del Tredici ont proposé à l'inverse de la cascade amyloïde que ce soient les neurones comportant des DNF qui sécrètent de l'A β fibrillaire (Braak et Del Tredici, 2013), mais cette hypothèse alternative n'est pas compatible avec l'agrégation de protéines Tau anormales observée durant les premiers stades de Braak sans accumulation d'A β (Braak et Braak, 1997). Nous avons, quant à nous, observé des dépôts d'A β dans le subiculum et le corps mamillaire en l'absence de pathologie Tau dans les neurones du subiculum ou dans leurs axones localisés dans le pilier du fornix (cas 05). Il ne s'agit que d'un seul cas sur l'ensemble de la série, mais il nous oblige à reconsidérer la relation de cause (agrégation de Tau) à effet (accumulation d'A β) que toutes les autres observations nous poussent à accepter.

4. Hypothèses physiopathologiques

Un autre scénario reste à discuter : l'accumulation d'A β et l'agrégation de Tau pourraient agir en synergie, après avoir été indépendamment initiées.

- **Hypothèse 1 : la pathologie Tau axonale favorise l'accumulation d'A β (Figure 25a)**

Dans le système subiculo-fornico-mamillaire, l'accumulation de Tau-p dans les neurones du subiculum et dans leurs axones localisés dans le pilier du fornix précède généralement l'accumulation d'A β dans le corps mamillaire (tous les cas à l'exception du cas 05). Des observations analogues ont été rapportées dans la formation hippocampique, où les plaques séniles apparaissent préférentiellement là où projettent les neurones porteurs de DNF (Braak et Braak, 1999; Schönheit et al., 2004). Les accumulations intra-axonales de Tau-p observées dans le pilier du fornix étaient associées à la présence de sphéroïdes axonaux, témoins d'une dégénérescence axonale, ainsi qu'à la formation de terminaisons axonales APP positives dans le corps mamillaire. Cette séquence d'évènements, qui évoque les altérations axonales observées lors de lésions cérébrales traumatiques (Johnson et al., 2010), peut être à l'origine d'une élévation des quantités d'A β dans le site de projection des axones lésés par augmentation

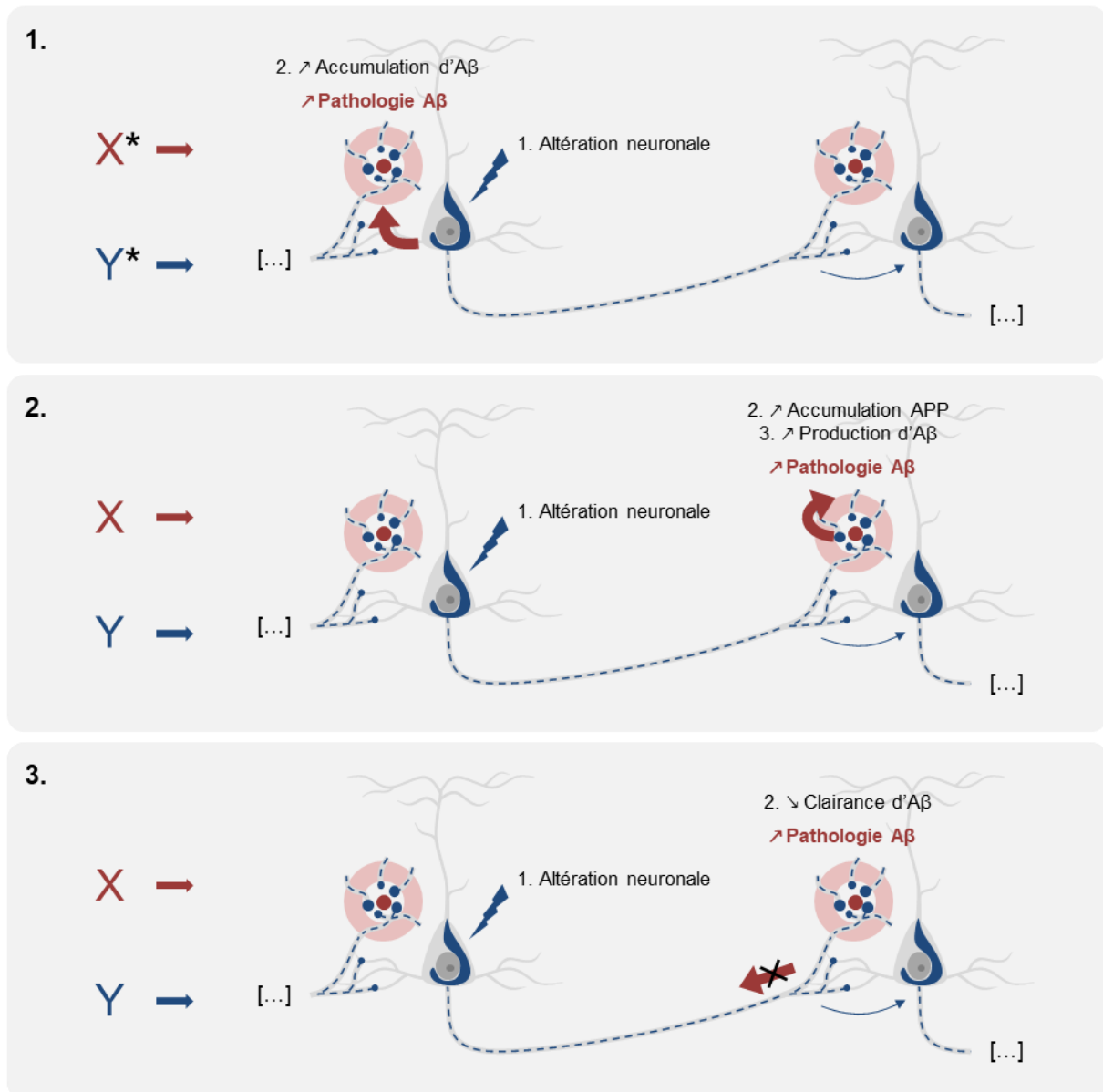
de sa production locale, ou par diminution de la clairance de l'A β dans le corps mamillaire (si l'on formule l'hypothèse que les terminaisons axonales résorbent l'A β extracellulaire). De nombreuses études expérimentales indiquent cependant que l'induction expérimentale de l'agrégation de Tau, par croisement génétique (Héraud et al., 2014; Lewis et al., 2001; Pooler et al., 2015) ou par inoculation intracérébrale (He et al., 2017; Vergara et al., 2019) ne favorise pas l'accumulation d'A β chez les souris tg *APP/PS1* ou *5xFAD*. En revanche, la déplétion du gène *MAPT* chez la souris tg *APP/PS1* ralentit la formation de dépôts d'A β en limitant les altérations axonales associées à la couronne neuritique, dans laquelle une diminution des quantités d'APP et de BACE1 est par ailleurs constatée (Peters et al., 2019). L'agrégation de Tau ne favorise donc pas directement l'agrégation de l'A β mais pourrait favoriser son accumulation de façon indirecte : la pathologie Tau est associée à une dégénérescence axonale pouvant conduire à la synthèse anormale d'A β ou à un déficit de résorption du peptide au niveau des terminaisons synaptiques endommagées – qui constitueraient la couronne neuritique des plaques séniles. Ce processus, probablement lent et discret, est difficile à mettre en évidence expérimentalement mais il pourrait expliquer la précédece habituelle des lésions Tau que nous avons observée chez l'Homme.

- **Hypothèse 2 : l'accumulation d'A β exacerbe la pathologie Tau axonale (Figure 25b)**

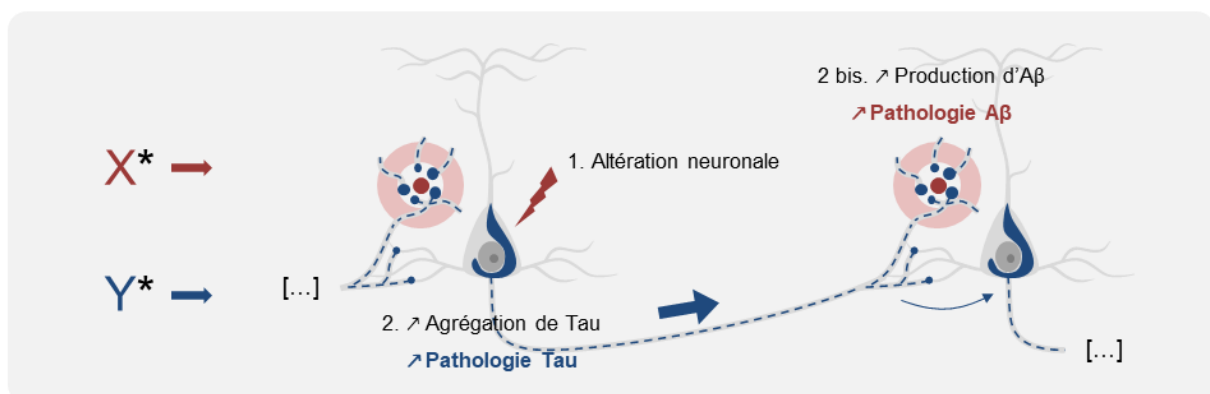
Les données expérimentales sont en faveur de l'hypothèse alternative d'une promotion de la pathologie Tau par l'A β . L'accumulation d'A β exacerbe en effet l'agrégation et la diffusion des lésions Tau (He et al., 2017; Héraud et al., 2014; Lewis et al., 2001; Pooler et al., 2015; Vergara et al., 2019), éventuellement via une interaction avec la protéine prion PrPc (Gomes et al., 2019). Extrapolés à nos observations chez l'Homme, ces résultats expérimentaux suggèrent que l'accumulation d'A β dans le subiculum, puis dans le corps mamillaire, amplifie la pathologie Tau. L'augmentation simultanée des pathologies Tau et A β qui en résulte explique les corrélations positives obtenues.

Nos observations et les données de la littérature indiquent donc que la pathologie Tau n'est pas induite par l'accumulation d'A β : aucun modèle expérimental *in vivo*, même lorsque tous les protagonistes moléculaires ont été « humanisés », n'a pu mettre en évidence une telle induction. Chez l'Homme, la transmission d'une pathologie amyloïde n'est pas associée à une agrégation de Tau, et ce même après de très longues périodes d'incubation. D'autre part, la pathologie Tau précède l'accumulation de l'A β dans les formes sporadiques et ne débute pas plus tôt dans les formes familiales de la maladie ou dans la trisomie 21. Il n'y a donc pas de

a. Scénarios hypothétiques d'un effet de promotion de la Tau sur l'Aβ



b. Scénario hypothétique d'un effet de promotion de l'Aβ sur la Tau



* X et Y représentent les causes indépendantes des pathologies Aβ et Tau, respectivement

Figure 25 : Scénarios hypothétiques des relations de synergie entre les pathologies Tau et Aβ. X et Y représentent les causes indépendantes des pathologies Aβ et Tau, respectivement. Les éléments et événements

associés à la pathologie A β sont représentés en rouge, ceux se référant à la pathologie Tau sont indiqués en bleu.

a) Scénarios hypothétiques d'une promotion de la pathologie Tau sur la pathologie A β . En induisant un dysfonctionnement neuronal global, la pathologie Tau 1) augmente l'accumulation d'A β au niveau somato-dendritique (e.g. saturation du protéasome, entrave au trafic intracellulaire,...) et 2-3) conduit à la dégénérescence des axones 2) résultant en l'accumulation d'APP et de ses enzymes protéolytiques au niveau des terminaisons axonales dystrophiques où la sécrétion d'A β augmente, ou 3) empêchant la clairance de l'A β par un transport axonal rétrograde, ce qui favorise l'accumulation d'A β à proximité des terminaisons axonales. b) Scénarios hypothétiques d'une promotion de la pathologie A β sur la pathologie Tau. L'A β favorise l'agrégation des protéines Tau et exacerbe ainsi la progression de la pathologie Tau de neurone en neurone.

relation de cause à effet entre l'une et l'autre pathologie. En revanche, toutes les observations expérimentales ou humaines sont en faveur d'une promotion (à sens unique) de la pathologie Tau par l'accumulation d'A β . Cet effet de promotion est-il réellement à sens unique sur le long terme ? Nos résultats supportent la possibilité d'un rôle indirect de la pathologie Tau sur l'accumulation d'A β . La pathologie Tau précède la pathologie A β dans la population générale (contrairement à ce qui est observé dans les cas familiaux). Cette antériorité pourrait être expliquée par une promotion de la pathologie A β par les dommages axonaux provoqués par la pathologie Tau. Comme nous venons de le voir, l'effet pourrait être subtil et se produire sur la durée (*i.e.* lors d'observation chez l'Homme), échappant ainsi à la démonstration expérimentale. Un autre débat concerne la « maladie » d'Alzheimer, si l'on considère qu'une maladie est définie par les symptômes qu'elle provoque et non par son mécanisme physiopathologique. Sous cet aspect, la situation est claire : les symptômes de la MA relèvent de la tauopathie (Nelson et al., 2012). Même dans une mutation pénétrante (comme la mutation E280A de *PSENI* observée dans une grande famille colombienne), l'accumulation d'A β n'est pas associée à un déficit cognitif sévère lorsqu'elle ne s'accompagne pas d'une tauopathie importante, comme c'est le cas lorsqu'une mutation additionnelle Christchurch (R136S) de

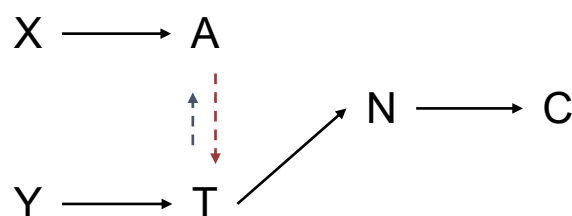


Figure 26 : Modèle proposé. Les relations de cause à effet de la cascade pathologique sont représentées par des flèches continues, les relations de promotion par des flèches pointillées. La taille des flèches pointillées représente leur importance relative. X et Y : causes indépendantes des pathologies A β et Tau, respectivement ; A : β -amyloïde ; T : Tau ; N : neurodégénérescence ; C : signes cliniques.

Mode de représentation schématique inspiré de Jack et al., 2018.

l'*APOE3* limite la diffusion de Tau (Arboleda-Velasquez et Lopera, 2019). Sous cet aspect, donc, la MA est une tauopathie primaire, amplifiée par l'accumulation d'A β , qu'elle accentuerait indirectement (**Figure 26**). La plaque sénile constitue un site privilégié pour ces relations synergiques entrecroisées.

5. Conclusions et perspectives

Nous avons pu mettre en évidence la propagation axonale de la pathologie Tau dans le système subiculo-fornico-mamillaire. Les stades de Braak et Braak (Braak et Braak, 1991), démontrant le lien entre la progression de la pathologie Tau et les connexions, suggèrent qu'il en est de même dans le reste de l'encéphale : des espèces mal conformées de Tau présentes dans le soma neuronal sont transportées par l'axone et franchissent des synapses pour contaminer d'autres neurones connectés. Il est cependant possible que les neurones soient plus ou moins susceptibles de développer des agrégats de Tau. Les modalités de progression de la pathologie Tau pourraient être à l'intersection de deux phénomènes : le transport de « propagons », superposé à la vulnérabilité sélective des neurones récepteurs – comme ce qui est d'ailleurs suggéré dans la maladie de Parkinson (Brundin et Melki, 2017; Surmeier et al., 2017). Si notre étude a permis de préciser le mode de propagation de la pathologie Tau dans le système subiculo-fornico-mamillaire, celui des dépôts d'A β reste éluif : nous avons pu mettre en évidence une progression de cette pathologie, sans pouvoir en préciser les voies. Sa distribution suggère parfois une diffusion dans le milieu extracellulaire, parfois un transport par les faisceaux de connexions, sans qu'aucune preuve expérimentale convaincante d'un mode de propagation déterminé ait été établie. Il est par ailleurs curieux de constater que la transmission inter-individuelle a été prouvée chez l'Homme pour la pathologie A β , alors qu'elle n'est encore que suggérée pour la pathologie Tau. Cette disparité pourrait être liée à la localisation extracellulaire de la première, tandis que l'induction de la seconde nécessite au préalable l'internalisation neuronale des propagons exogènes.

Nos connaissances des mécanismes qui sous-tendent la conversion – conversion d'une protéine bien repliée en son homologue mal repliée – sont aujourd'hui encore très limitées. Il suffit de constater les difficultés à mettre au point les techniques d'amplification *in vitro*, comme la PMCA (pour « *protein misfolding cyclic amplification* ») ou la RT-QuIC (pour « *real-time quaking-induced conversion* »), pour réaliser que de nombreux paramètres demeurent mal maîtrisés. En outre, des co-facteurs présents dans les homogénats encéphaliques interviennent probablement dans ce processus de conversion ; beaucoup reste à faire pour les

identifier et comprendre leur mode d'action. Les progrès des méthodes d'analyse structurale, telles que la cryo-microscopie électronique, ont récemment permis des avancées considérables dans la caractérisation conformationnelle d'assemblages fibrillaires de Tau (Falcon et al., 2018b; Fitzpatrick et al., 2017) et d'A β (Kollmer et al., 2019) observés dans la MA. L'étude de fractions protéiques insolubles introduit toutefois un biais en sélectionnant des assemblages tardifs, probablement peu voire pas impliqués dans la propagation des lésions. L'isolement et la caractérisation, chez l'Homme, d'espèces moléculaires solubles impliquées dans le mécanisme de propagation et généralement qualifiées d'oligomères, constituent le prochain défi majeur. Elles nécessitent l'emploi de techniques de purification adaptées, telles que la centrifugation d'homogénats sur gradient de sucrose en présence de détergent, pour mieux individualiser les monomères et oligomères solubles (Laferrrière et al., 2019) – quoique le recours aux détergents puisse modifier la conformation des protéines peu agrégées. L'accès à ces espèces moléculaires solubles peut être facilité par une stratégie alternative de sélection anatomique : dans le pilier du fornix, les axones contenant les espèces de Tau non fibrillaires propageant la pathologie sont anatomiquement isolés du neuropile où s'entremêlent diverses espèces.

En dépit de ces limites, la découverte de mécanismes de propagation et de transmission associés à la MA, par l'action de protéines mal conformées, a permis un véritable changement de paradigme : elle conforte la notion de protéine infectieuse, imaginée par Prusiner sous la dénomination générale de prion (Prusiner, 1982). Cette révolution conceptuelle signifie qu'antérieurement, la compréhension de la MA ne concernait qu'une partie de la réalité : l'agrégation d'une protéine n'était que la conséquence de l'augmentation de sa production ou du déficit de son élimination, qui dépendaient d'activités enzymatiques susceptibles d'être thérapeutiquement modulées. Nous savons désormais qu'une protéine produite à des concentrations normales peut s'accumuler du fait d'un changement conformationnel. L'origine d'une telle conversion doit faire l'objet de plus amples recherches. Les dernières décennies reposaient sur l'étude de mutations ou de risques génétiques, alors même que la très grande majorité des cas de MA est sporadique. La possibilité de causes environnementales susceptibles de faire pénétrer dans l'organisme des propagons exogènes, provoquant l'agrégation de protéines endogènes normales, ne peut désormais pas être exclue. Leur recherche représente un défi épidémiologique majeur : les exemples précédemment cités de transmission inter-individuelle de l'amyloïdose cérébrale par les hormones de croissance ou les dures-mères contaminées témoignent de la nécessité de périodes d'incubation

particulièrement longues. Celles-ci peuvent durer plusieurs décennies, nécessitant des approches épidémiologiques complexes qui font encore défaut aujourd'hui, excepté lors de circonstances exceptionnelles (*e.g.* intervention chirurgicale susceptible de transmettre des propagons par l'utilisation d'instruments contaminés).

Ce travail permet d'obtenir une vue d'ensemble de la progression des lésions associées à la MA, tout en révélant les limites de nos connaissances actuelles. A défaut de pouvoir identifier les mécanismes à l'origine de la MA, la poursuite de ce projet permettra de comprendre davantage les modalités de propagation de la pathologie Tau, mieux corrélée aux symptômes cliniques que la pathologie A β (Nelson et al., 2012). Le fornix constitue en effet une structure anatomique idéale pour isoler et caractériser les espèces moléculaires de Tau axonales responsables de la propagation des lésions, en recourant aux méthodes d'analyse structurale actuelles telles que la cryo-microscopie électronique, ou par des analyses de résistance aux protéases.

Références

Références

- Aamodt EJ, Williams RC. Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochemistry* 1984;23:6023–31. <https://doi.org/10.1021/bi00320a019>.
- Abelein A, Abrahams JP, Danielsson J, Gräslund A, Jarvet J, Luo J, et al. The hairpin conformation of the amyloid β peptide is an important structural motif along the aggregation pathway Topical Issue in honor of Ivano Bertini Guest editors: Lucia Banci, Claudio Luchinat. *J Biol Inorg Chem* 2014;19:623–34. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1131-8>.
- Abid K, Soto C. The intriguing prion disorders. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2342–51. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6140-5>.
- Aggleton JP. Differential cognitive effects of colloid cysts in the third ventricle that spare or compromise the fornix. *Brain* 2000;123:800–15. <https://doi.org/10.1093/brain/123.4.800>.
- Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci* 1999;22:425–44. <https://doi.org/10.1017/S0140525X99002034>.
- Ahmed M, Davis J, Aucoin D, Sato T, Ahuja S, Aimoto S, et al. Structural conversion of neurotoxic amyloid-B 1-42 oligomers to fibrils. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:561–7. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1799>.
- Ahmed Z, Cooper J, Murray TK, Garn K, McNaughton E, Clarke H, et al. A novel in vivo model of tau propagation with rapid and progressive neurofibrillary tangle pathology: The pattern of spread is determined by connectivity, not proximity. *Acta Neuropathol* 2014;127:667–83. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1254-6>.
- Akiyama H, Mori H, Saido T, Kondo H, Ikeda K, McGeer PL. Occurrence of the diffuse amyloid β -protein (A β) deposits with numerous A β -containing glial cells in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Glia* 1999;25:324–31. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990215\)25:4<324::AID-GLIA2>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(19990215)25:4<324::AID-GLIA2>3.0.CO;2-5).
- Del Alonso A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 1996;2:783–7. <https://doi.org/10.1038/nm0796-783>.
- Del Alonso AC, Zaidi T, Grundke-iqbal I, Iqbal K. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. vol. 91. 1994.
- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967;214:764–6. <https://doi.org/10.1038/214764a0>.
- Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* 1966;22:278–84. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(66\)90478-5](https://doi.org/10.1016/0006-291X(66)90478-5).
- Ando K, Laborde Q, Lazar A, Godefroy D, Youssef I, Amar M, et al. Inside Alzheimer brain with CLARITY: senile plaques, neurofibrillary tangles and axons in 3-D. *Acta Neuropathol* 2014;128:457–9. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1322-y>.
- Androuin A, Potier B, Nägerl UV, Cattaert D, Danglot L, Thierry M, et al. Evidence for altered dendritic spine compartmentalization in Alzheimer's disease and functional effects in a mouse model. *Acta Neuropathol* 2018;135:839–54. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1847-6>.
- Arboleda-Velasquez JF, Lopera F. Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report. *Nat Med* 2019;25:1680–3. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0611-3>.

- Arends YM, Duyckaerts C, Rozemuller JM, Eikelenboom P, Hauw JJ. Microglia, amyloid and dementia in Alzheimer disease. A correlative study. *Neurobiol Aging* 2000;21:39–47. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00094-4](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00094-4).
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 1991;1:103–16. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.1.103>.
- Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* 2015;18:1584–93. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>.
- Attems J, Jellinger KA. Only cerebral capillary amyloid angiopathy correlates with Alzheimer pathology - A pilot study. *Acta Neuropathol* 2004;107:83–90. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0796-9>.
- Audouard E, Houben S, Masaracchia C, Yilmaz Z, Suain V, Authelet M, et al. High-molecular-weight paired helical filaments from Alzheimer brain induces seeding of wild-type mouse Tau into an argyrophilic 4R Tau pathology in vivo. *Am J Pathol* 2016;186:2709–22. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.008>.
- Bachevalier J, Parkinson JK, Mishkin M. Visual recognition in monkeys: effects of separate vs. combined transection of fornix and amygdalofugal pathways. *Exp Brain Res* 1985;57:554–61. <https://doi.org/10.1007/BF00237842>.
- Baker HF, Ridley RM, Duchen LW, Crow TJ, Bruton CJ. Induction of β (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate - Comparison with transmission of spongiform encephalopathy. *Mol Neurobiol* 1994;8:25–39. <https://doi.org/10.1007/BF02778005>.
- Bancher C, Brunner C, Lassmann H, Budka H, Jellinger K, Wiche G, et al. Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1989;477:90–9. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91396-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91396-6).
- Banerjee G, Adams ME, Jaunmuktane Z, Alistair Lammie G, Turner B, Wani M, et al. Early onset cerebral amyloid angiopathy following childhood exposure to cadaveric dura. *Ann Neurol* 2019;85:284–90. <https://doi.org/10.1002/ana.25407>.
- Barrow CJ, Zagorski MG. Solution structures of β peptide and its constituent fragments: Relation to amyloid deposition. *Science (80-)* 1991;253:179–82. <https://doi.org/10.1126/science.1853202>.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986;46:417–28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90662-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90662-8).
- Beck E, Daniel PM, Alpers M, Gajdusek DC, Gibbs CJ. Experimental “kuru” in chimpanzees. A pathological report. *Lancet* 1966;2:1056–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(66\)92031-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(66)92031-9).
- Bennhold H. Eine spezifische Amyloidfärbung mit Kongorot. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1922;69:1537–1538.
- Von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2005;1739:158–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.09.010>.
- Von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow EM, et al. Mutations of Tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local β -structure. *J Biol Chem* 2001;276:48165–74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105196200>.

- Von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow E-M, Mandelkow E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:5129–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5129>.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 1993;11:153–63. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90279-Z](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90279-Z).
- Bieschke J, Herbst M, Wiglenda T, Friedrich RP, Boeddrich A, Schiele F, et al. Small-molecule conversion of toxic oligomers to nontoxic β -sheet-rich amyloid fibrils. *Nat Chem Biol* 2012;8:93–101. <https://doi.org/10.1038/nchembio.719>.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 1985;101:1371–8. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1371>.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* (80-) 1982;218:1309–11. <https://doi.org/10.1126/science.6815801>.
- Boluda S, Iba M, Zhang B, Raible KM, Lee VMY, Trojanowski JQ. Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains. *Acta Neuropathol* 2015;129:221–37. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>.
- Braak F, Braak H, Mandelkow EM. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 1994;87:554–67. <https://doi.org/10.1007/BF00293315>.
- Braak H. Pigment architecture of the human telencephalic cortex - III. Regio praesubicularis. *Cell Tissue Res* 1978;190:509–23. <https://doi.org/10.1007/BF00219561>.
- Braak H, Braak E. Temporal sequence of Alzheimer's disease-related pathology, 1999, p. 475–512. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4885-0_14.
- Braak H, Braak E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 1997;18:351–7.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239–59.
- Braak H, Braak E. Neuropil threads occur in dendrites of tangle-bearing nerve cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1988;14:39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1988.tb00864.x>.
- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 1986;65:351–5.
- Braak H, Duyckaerts C, Braak E, Pielke F. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes correlates with psychometrically assessed intellectual status. In: B C, K I, M N, B W, H W, P Z, editors. *Neurobiol. Aging*, vol. 13, Elsevier BV; 1993, p. 131–7. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(92\)90298-c](https://doi.org/10.1016/0197-4580(92)90298-c).
- Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: Age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol* 2011;70:960–9. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379>.
- Braak H, Del Tredici K. Amyloid- β may be released from non-junctional varicosities of axons generated from abnormal tau-containing brainstem nuclei in sporadic Alzheimer's disease: a hypothesis. *Acta*

- Neuropathol 2013;126:303–6. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1153-2>.
- Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9).
- Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VMY. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 1993;10:1089–99. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90057-X).
- Brandt R, Léger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 1995;131:1327–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.5.1327>.
- Bright J, Hussain S, Dang V, Wright S, Cooper B, Byun T, et al. Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiol Aging* 2015;36:693–709. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.007>.
- Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J. Mise en évidence immunologique de la protéine Tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol (Bruxelles)* 1985;95:229–35.
- Brothers HM, Gosztyla ML, Robinson SR. The physiological roles of amyloid- β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2018;10. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>.
- Brown P, Brandel JP, Sato T, Nakamura Y, MacKenzie J, Will RG, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* 2012;18:901–7. <https://doi.org/10.3201/eid1806.120116>.
- Brundin P, Melki R. Prying into the prion hypothesis for parkinson's disease. *J Neurosci* 2017;37:9808–18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1788-16.2017>.
- Bubb EJ, Kinnavane L, Aggleton JP. Hippocampal–diencephalic–cingulate networks for memory and emotion: an anatomical guide. *Brain Neurosci Adv* 2017;1:239821281772344. <https://doi.org/10.1177/2398212817723443>.
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993;73:1339–47. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90360-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90360-3).
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/ β amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 1992;267:546–54.
- Burwinkel M, Lutzenberger M, Heppner FL, Schulz-Schaeffer W, Baier M. Intravenous injection of beta-amyloid seeds promotes cerebral amyloid angiopathy (CAA). *Acta Neuropathol Commun* 2018;6:23. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0511-7>.
- Calabrese P, Markowitsch HJ, Harders AG, Scholz M, Gehlen W. Fornix damage and memory: a case report. *Cortex* 1995;31:555–64. [https://doi.org/10.1016/S0010-9452\(13\)80066-4](https://doi.org/10.1016/S0010-9452(13)80066-4).
- Calafate S, Buist A, Miskiewicz K, Vijayan V, Daneels G, de Strooper B, et al. Synaptic contacts enhance cell-to-cell tau pathology propagation. *Cell Rep* 2015;11:1176–83. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>.
- Cali I, Cohen ML, Haik S, Parchi P, Giaccone G, Collins SJ, et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease with Amyloid- β pathology: an international study. *Acta Neuropathol Commun* 2018;6:5. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0503-z>.
- de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, et al.

- Propagation of Tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 2012;73:685–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>.
- Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA. Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 1984;66:305–11. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(84\)90007-5](https://doi.org/10.1016/0300-9084(84)90007-5).
- Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 1996;271:32789–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32789>.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991;353:844–6. <https://doi.org/10.1038/353844a0>.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 1992;360:674–7. <https://doi.org/10.1038/360674a0>.
- Chen YR, Glabe CG. Distinct early folding and aggregation properties of Alzheimer amyloid- β peptides A β 40 and A β 42: Stable trimer or tetramer formation by A β 42. *J Biol Chem* 2006;281:24414–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602363200>.
- Chesebro B, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 1985;315:331–3. <https://doi.org/10.1038/315331a0>.
- Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3590–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3590>.
- Chukwu JE, Pedersen JT, Pedersen L, Volbracht C, Sigurdsson EM, Kong XP. Tau antibody structure reveals a molecular switch defining a pathological conformation of the Tau protein. *Sci Rep* 2018;8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24276-4>.
- Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, et al. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *PNAS* 2013;110:9535–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009;11:909–13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- Clavaguera F, Grueninger F, Tolnay M. Intercellular transfer of tau aggregates and spreading of tau pathology: Implications for therapeutic strategies. *Neuropharmacology* 2014;76:9–15. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.08.037>.
- Cohen AS, Calkins E. The isolation of amyloids fibrils and a study of the effect of collagenase and hyaluronidase. *J Cell Biol* 1964;21:481–6. <https://doi.org/10.1083/jcb.21.3.481>.
- Cohen M, Appleby B, Safar JG. Distinct prion-like strains of amyloid beta implicated in phenotypic diversity of Alzheimer's disease. *Prion* 2016;10:9–17. <https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1123371>.
- Colin M, Dujardin S, Schraen-Maschke S, Meno-Tetang G, Duyckaerts C, Courade JP, et al. From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathol* 2020;139:3–25. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02087-9>.
- Copenhaver BR, Rabin LA, Saykin AJ, Roth RM, Wishart HA, Flashman LA, et al. The fornix and

- mammillary bodies in older adults with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and cognitive complaints: A volumetric MRI study. *Psychiatry Res - Neuroimaging* 2006;147:93–103. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2006.01.015>.
- Cox B, Ness F, Tuite M. Analysis of the generation and segregation of propagons: Entities that propagate the [PSI⁺] prion in yeast. *Genetics* 2003;165:23–33.
- Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider J a, Abisambra JF, Abner EL, Alafuzoff I, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* 2014;128:755–66. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1349-0>.
- Cras P, Smith MA, Richey PL, Siedlak SL, Mulvihill P, Perry G. Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 1995;89:291–5. <https://doi.org/10.1007/BF00309621>.
- Crehan H, Hardy J, Pocock J. Microglia, Alzheimer's disease, and complement. *Int J Alzheimers Dis* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/983640>.
- Crook R, Verkkoniemi A, Perez-Tur J, Mehta N, Baker M, Houlden H, et al. A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nat Med* 1998;4:452–5. <https://doi.org/10.1038/nm0498-452>.
- Cuillé J, Chelle P. La « tremblante du mouton » est-elle déterminée par un virus filtrable ? *CR Acad Sci* 1938;206:1687.
- Cuillé J, Chelle P. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad Sci* 1936;203:1552.
- D'Orange M, Aurégan G, Cheramy D, Gaudin-Guérif M, Lieger S, Guillermier M, et al. Potentiating tangle formation reduces acute toxicity of soluble tau species in the rat. *Brain* 2018;141:535–49. <https://doi.org/10.1093/brain/awx342>.
- Daitz H. Note on the fibre content of the fornix system in man. *Brain* 1953;76:509–12. <https://doi.org/10.1093/brain/76.3.509>.
- Delacourte A, Defossez A. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 1986;76:173–86. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(86\)90167-X](https://doi.org/10.1016/0022-510X(86)90167-X).
- Delaère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ. Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol* 1991;81:328–35. <https://doi.org/10.1007/bf00305876>.
- Delaère P, Duyckaerts C, Masters C, Beyreuther K, Piette F, Hauw JJ. Large amounts of neocortical β A4 deposits without neuritic plaques nor tangles in a psychometrically assessed, non-demented person. *Neurosci Lett* 1990;116:87–93. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90391-L](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90391-L).
- Delaère P, He Y, Fayet G, Duyckaerts C, Hauw JJ. β A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: An immunocytochemical study of 20 french centenarians. *Neurobiol Aging* 1993;14:191–4. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90096-T](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90096-T).
- Delay J, Brion S. *Le syndrome de Korsakoff*. Masson & C. Paris: 1969.
- Despres C, Byrne C, Qi H, Cantrelle FX, Huvent I, Chambraud B, et al. Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:9080–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708448114>.
- Dickinson AG, Taylor DM. Resistance of scrapie agent to decontamination. *N Engl J Med*

- 1978;299:1413–4. <https://doi.org/10.1056/NEJM197812212992512>.
- Dillingham CM, Vann SD. Why isn't the head direction system necessary for direction? Lessons from the lateral mammillary nuclei. *Front Neural Circuits* 2019;13:60. <https://doi.org/10.3389/fncir.2019.00060>.
- Divry P. Etude histochemique des plaques séniles. *J Belge Neurol Psych* 1927;9:643–657.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Cummings J, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* 2007;6:734–46. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70178-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70178-3).
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Hampel H, Molinuevo L, Blennow K, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. vol. 13. 2014. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70090-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70090-0).
- Dubois B, Touchon J, Portet F, Ousset PJ, Vellas B, Michel B. ["The 5 words": a simple and sensitive test for the diagnosis of Alzheimer's disease]. *Presse Med* 2002;31:1696–9.
- Duyckaerts C, Bennefib M, Grignon Y, Uchihara T, He Y, Piette F, et al. Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status. *Neurobiol Aging* 1997;18:267–73. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)80306-5](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)80306-5).
- Duyckaerts C, Braak H, Brion J-P, Buée L, Del Tredici K, Goedert M, et al. PART is part of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 2015;129:749–56. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1390-7>.
- Duyckaerts C, Colle MA, Dessi F, Piette F, Hauw JJ. Progression of Alzheimer histopathological changes. *Acta Neurol Belg* 1998;98:180–5.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier M-C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 2009;118:5–36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>.
- Duyckaerts C, Dickson D. Neuropathology of Alzheimer's disease and its variants. *Neurodegener. Mol. Pathol. Dement. Mov. Disord.*, Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2011, p. 62–91. <https://doi.org/10.1002/9781444341256.ch10>.
- Duyckaerts C, Godefroy G. Voronoi tessellation to study the numerical density and the spatial distribution of neurones. *J Chem Neuroanat* 2000;20:83–92. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(00\)00064-8](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(00)00064-8).
- Duyckaerts C, Godefroy G, Hauw JJ. Evaluation of neuronal numerical density by Dirichlet tessellation. *J Neurosci Methods* 1994;51:47–69. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90025-6).
- Duyckaerts C, Hauw J-J. Prevalence, incidence and duration of Braak's stages in the general population: can we know? *Neurobiol Aging* 1997;18:362–9.
- Duyckaerts C, Hauw JJ, Piette F, Rainsard C, Poulain V, Berthaux P, et al. Cortical atrophy in senile dementia of the Alzheimer type is mainly due to a decrease in cortical length. *Acta Neuropathol* 1985;66:72–4. <https://doi.org/10.1007/BF00698298>.
- Duyckaerts C, Kawasaki H, Delaere P, Rainsard C, Hauw J-J. Fibre disorganization in the neocortex of patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1989;233–47.
- Duyckaerts C, Sazdovitch V, Ando K, Seilhean D, Privat N, Yilmaz Z, et al. Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease and immunoassay of French cadaver-sourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of Abeta pathology. *Acta Neuropathol* 2018;135:201–12. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1791-x>.

- Duyckaerts C, Uchihara T, Seilhean D, He Y, Hauw J-J. Dissociation of Alzheimer type pathology in a disconnected piece of cortex. *Acta Neuropathol* 1997;93:501–7.
- Edbauer D, Winkler E, Regula JT, Pesold B, Steiner H, Haass C. Reconstitution of γ -secretase activity. *Nat Cell Biol* 2003;5:486–8. <https://doi.org/10.1038/ncb960>.
- Eisele YS, Bolmont T, Heikenwalder M, Langer F, Jacobson LH, Yan ZX, et al. Induction of cerebral β -amyloidosis: Intracerebral versus systemic A β inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12926–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903200106>.
- Eisele YS, Duyckaerts C. Propagation of A β pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol* 2016;131:5–25.
- Eisele YS, Fritschi SK, Hamaguchi T, Obermüller U, Föger P, Skodras A, et al. Multiple factors contribute to the peripheral induction of cerebral β -amyloidosis. *J Neurosci* 2014;34:10264–73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1608-14.2014>.
- Eisele YS, Obermüller U, Heilbronner G, Baumann F, Kaeser SA, Wolburg H, et al. Peripherally applied A β -containing inoculates induce cerebral β -amyloidosis. *Science* (80-) 2010;330:980–2. <https://doi.org/10.1126/science.1194516>.
- Falcon B, Cavallini A, Angers R, Glover S, Murray TK, Barnham L, et al. Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J Biol Chem* 2015;290:1049–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589309>.
- Falcon B, Zhang W, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, Vidal R, et al. Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature* 2018a;561:137–40. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0454-y>.
- Falcon B, Zhang W, Schweighauser M, Murzin AG, Vidal R, Garringer HJ, et al. Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathol* 2018b;136:699–708. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1914-z>.
- Falcon B, Zivanov J, Zhang W, Murzin AG, Garringer HJ, Vidal R, et al. Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature* 2019;568:420–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1026-5>.
- Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4162–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0230450100>.
- Fernández-Borges N, Di Bari MA, Eraña H, Sánchez-Martín M, Pirisinu L, Parra B, et al. Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions. *Acta Neuropathol* 2018;135:179–99. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1782-y>.
- Fitzpatrick AWP, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, et al. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* 2017;547:185–90. <https://doi.org/10.1038/nature23002>.
- Frackowiak J, Wisniewski HM, Wegiel J, Merz GS, Iqbal K, Wang KC. Ultrastructure of the microglia that phagocytose amyloid and the microglia that produce β -amyloid fibrils. *Acta Neuropathol* 1992;84:225–33. <https://doi.org/10.1007/BF00227813>.
- Friedrich N, Kekulé A. Zur Amyloidfrage. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 1859;16:50–65.
- Fritschi SK, Langer F, Kaeser SA, Maia LF, Portelius E, Pinotsi D, et al. Highly potent soluble amyloid- β seeds in human Alzheimer brain but not cerebrospinal fluid. *Brain* 2014;137:2909–15.

<https://doi.org/10.1093/brain/awu255>.

- Frontzek K, Lutz M, Aguzzi A, Kovacs G, Budka H. Amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy are frequent in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting. *Swiss Med Wkly* 2016;146:w14287. <https://doi.org/10.4414/smw.2016.14287>.
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of Tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 2009;284:12845–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
- Furman JL, Holmes BB, Diamond MI. Sensitive detection of proteopathic seeding activity with FRET flow cytometry. *J Vis Exp* 2015:e53205. <https://doi.org/10.3791/53205>.
- Furman JL, Vaquer-Alicea J, White CL, Cairns NJ, Nelson PT, Diamond MI. Widespread tau seeding activity at early Braak stages. *Acta Neuropathol* 2017;133:91–100. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1644-z>.
- Gaffan D, Saunders RC, Gaffan EA, Harrison S, Shields C, Owen MJ. Effects of fornix transection upon associative memory in monkeys: Role of the hippocampus in learned action. *Q J Exp Psychol Sect B* 1984;36:173–221. <https://doi.org/10.1080/14640748408402203>.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Transmission and passage of experimental “kuru” to chimpanzees. *Science* (80-) 1967;155:212–4. <https://doi.org/10.1126/science.155.3759.212>.
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 1966;209:794–6. <https://doi.org/10.1038/209794a0>.
- Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the. *N Engl J Med* 1957;257:974–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM195711142572005>.
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, et al. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10032–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1630428100>.
- Gamper E. Zur frage der polioencephalitis haemorrhagica der chronischen alkoholiker. anatomische befunde beim alkoholischen Korsakow und ihre beziehungen zum klinischen bild. *Dtsch Z Nervenheilkd* 1928;102:122–9. <https://doi.org/10.1007/BF01668327>.
- Garcia-Bengochea F, Friedman WA. Persistent memory loss following section of the anterior fornix in humans. A historical review. *Surg Neurol* 1987;27:361–4. [https://doi.org/10.1016/0090-3019\(87\)90012-7](https://doi.org/10.1016/0090-3019(87)90012-7).
- George S, Rönnbäck A, Gouras GK, Petit GH, Grueninger F, Winblad B, et al. Lesion of the subiculum reduces the spread of amyloid beta pathology to interconnected brain regions in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Acta Neuropathol Commun* 2014;2. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-17>.
- German DC, White CL, Sparkman DR. Alzheimer’s disease: Neurofibrillary tangles in nuclei that project to the cerebral cortex. *Neuroscience* 1987;21:305–12. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(87\)90123-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(87)90123-0).
- Ghag G, Bhatt N, Cantu D V., Guerrero-Munoz MJ, Ellsworth A, Sengupta U, et al. Soluble tau aggregates, not large fibrils, are the toxic species that display seeding and cross-seeding behavior. *Protein Sci* 2018;27:1901–9. <https://doi.org/10.1002/pro.3499>.
- Giaccone G, Maderna E, Marucci G, Catania M, Erbetta A, Chiapparini L, et al. Iatrogenic early onset cerebral amyloid angiopathy 30 years after cerebral trauma with neurosurgery: vascular amyloid deposits are made up of both A β 40 and A β 42. *Acta Neuropathol Commun* 2019;7:70. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0719-1>.

- Gibbs CJ, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, et al. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): Transmission to the chimpanzee. *Science* (80-) 1968;161:388–9. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.388>.
- Glennner GG. Amyloid deposits and amyloidosis: the β -fibrilloses. *N Engl J Med* 1980;302:1343. <https://doi.org/10.1056/NEJM198006053022305>.
- Glennner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:885–90. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4).
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991;349:704–6. <https://doi.org/10.1038/349704a0>.
- Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 1995;189:167–70. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11484-E](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11484-E).
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989;3:519–26. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9).
- Gomes LA, Hipp SA, Rijal Upadhaya A, Balakrishnan K, Ospitalieri S, Koper MJ, et al. A β -induced acceleration of Alzheimer-related τ -pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathol* 2019;138:913–41. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02053-5>.
- Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1997;41:17–24. <https://doi.org/10.1002/ana.410410106>.
- Gong C -X, Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 1993;61:921–7. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03603.x>.
- Götz J, Chen F, Van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* (80-) 2001;293:1491–5. <https://doi.org/10.1126/science.1062097>.
- Goudsmit J, Morrow CH, Asher DM, Yanagihara RT, Masters CL, Gibbs CJ, et al. Evidence for and against the transmissibility of alzheimer disease. *Neurology* 1980;30:945–50. <https://doi.org/10.1212/wnl.30.9.945>.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI. Hydrofluoric acid-treated τ (PHF) proteins display the same biochemical properties as normal τ . *J Biol Chem* 1992;267:564–9.
- Gremer L, Schölzel D, Schenk C, Reinartz E, Labahn J, Ravelli RBG, et al. Fibril structure of amyloid- β (1-42) by cryo-electron microscopy. *Science* (80-) 2017;358:116–9. <https://doi.org/10.1126/science.aao2825>.
- Grignon Y, Duyckaerts C, Bannecib M, Hauw J-J. Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer ' s disease. *Acta Neuropathol* 1998;95:395–406.
- Grinberg LT, Rüb U, Ferretti REL, Nitrini R, Farfel JM, Polichiso L, et al. The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset? *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009;35:405–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00997.x>.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated

- protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 1986a;261:6084–9.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* 1986b;83:4913–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Wang GP, Wisniewski HW. Alzheimer paired helical filaments: Cross-reacting polypeptide/s normally present in brain. *Acta Neuropathol* 1985;66:52–61. <https://doi.org/10.1007/BF00698295>.
- Gudden H. Klinische und anatomische beitrage zur kenntnis der multiplen alkoholneuritis nebst bemärkungen über die regerationsvorgänge in peripheren nervensystem. *Arch Psychiatry Nervenkrankheiten* 1896;28:643–741.
- Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:857–81. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb00954.x>.
- Guo JL, Covell DJ, Daniels JP, Iba M, Stieber A, Zhang B, et al. Distinct α -synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell* 2013;154:103. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.057>.
- Guo JL, Lee VMY. Seeding of normal tau by pathological tau conformers drives pathogenesis of Alzheimer-like tangles. *J Biol Chem* 2011;286:15317–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.209296>.
- Guo JL, Narasimhan S, Changolkar L, He Z, Stieber A, Zhang B, et al. Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *J Exp Med* 2016;213:2635–54. <https://doi.org/10.1084/jem.20160833>.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, et al. Amyloid β -peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992;359:322–5. <https://doi.org/10.1038/359322a0>.
- Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:101–12. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>.
- Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 1993;75:1039–42. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90312-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90312-e).
- Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet* 1959;274:289–90. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(59\)92081-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(59)92081-1).
- Hamaguchi T, Eisele YS, Varvel NH, Lamb BT, Walker LC, Jucker M. The presence of A β seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A β deposition in the brain. *Acta Neuropathol* 2012;123:31–7. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0912-1>.
- Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, et al. Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A β deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol* 2016;132:313–5. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1588-3>.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, et al. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 1994;369:488–91. <https://doi.org/10.1038/369488a0>.

- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (80-) 1992;256:184–5.
- Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT. Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* 1997;4:119–25. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90255-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90255-6).
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:574–81. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1591>.
- Hauw J, Feske S, Amarenco P, De Girolami U. Vascular pathology. In: Gray F, Duyckaerts C, De Girolami U, editors. *Man. basic Neuropathol*. 6th Ed. Oxford Uni, 2019, p. 82–121.
- Hayakawa T, Zyo K. Fine structure of the lateral mammillary projection to the dorsal tegmental nucleus of gudden in the rat. *J Comp Neurol* 1990;298:224–36. <https://doi.org/10.1002/cne.902980207>.
- He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L, et al. Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat Med* 2017;24:29–38. <https://doi.org/10.1038/nm.4443>.
- Heilbronner G, Eisele YS, Langer F, Kaeser SA, Novotny R, Nagarathinam A, et al. Seeded strain-like transmission of β -amyloid morphotypes in APP transgenic mice. *EMBO Rep* 2013;14:1017–22. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.137>.
- Henríquez JP, Cross D, Vial C, Maccioni RB. Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct* 1995;13:239–50. <https://doi.org/10.1002/cbf.290130404>.
- Héraud C, Goufak D, Ando K, Leroy K, Suain V, Yilmaz Z, et al. Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol Dis* 2014;62:100–12. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.09.010>.
- Hervé D, Porché M, Cabrejo L, Guidoux C, Tournier-Lasserre E, Nicolas G, et al. Fatal A β cerebral amyloid angiopathy 4 decades after a dural graft at the age of 2 years. *Acta Neuropathol* 2018;135:801–3. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1828-9>.
- Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, Yamasaki TR, Mirbaha H, Eades WC, et al. Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E4376–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411649111>.
- Hu W, Zhang X, Tung YC, Xie S, Liu F, Iqbal K. Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimer's Dement* 2016;12:1066–77. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.014>.
- Huang LW, Simonnet J, Nassar M, Richevaux L, Lofredi R, Fricker D. Laminar localization and projection-specific properties of presubicular neurons targeting the lateral mammillary nucleus, thalamus, or medial entorhinal cortex. *ENeuro* 2017;4. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0370-16.2017>.
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 2012;8:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.10.007>.
- Hyman BT, Trojanowski JQ. Editorial on consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer disease from the national institute on aging and the Reagan institute working group on diagnostic criteria for the neuropathological assessment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56:1095–7. <https://doi.org/10.1097/00005072-199710000-00002>.

- Iba M, Guo JL, McBride JD, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VMY. Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of alzheimer's-like tauopathy. *J Neurosci* 2013;33:1024–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-12.2013>.
- Iba M, McBride JD, Guo JL, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y. Tau pathology spread in PS19 tau transgenic mice following locus coeruleus (LC) injections of synthetic tau fibrils is determined by the LC's afferent and efferent connections. *Acta Neuropathol* 2015;130:349–62. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1458-4>.
- Iqbal K, Wisniewski HM, Grundke-Iqbal I, Korthals JK, Terry RD. Chemical pathology of neurofibrils. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's presenile-senile dementia. *J Histochem Cytochem* 1975;23:563–9. <https://doi.org/10.1177/23.7.1141687>.
- Ito S, Ohtsuki S, Kamiie J, Nezu Y, Terasaki T. Cerebral clearance of human amyloid- β peptide (1-40) across the blood-brain barrier is reduced by self-aggregation and formation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 ligand complexes. *J Neurochem* 2007;103:2482–90. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04938.x>.
- Iwasaki Y, Imamura K, Iwai K, Kobayashi Y, Akagi A, Mimuro M, et al. Autopsied case of non-plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease presenting with extensive amyloid- β deposition. *Neuropathology* 2018;38:549–56. <https://doi.org/10.1111/neup.12503>.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M, Hosoki E, et al. Identification of the major A β 1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 2000;6:143–50. <https://doi.org/10.1038/72237>.
- Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Budd Haeberlein S, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease HHS Public Access Author manuscript. *Alzheimers Dement* 2018;14:535–62. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>.
- Jackson SJ, Kerridge C, Cooper J, Cavallini A, Falcon B, Cella C V., et al. Short fibrils constitute the major species of seed-competent tau in the brains of mice transgenic for human p301s tau. *J Neurosci* 2016;36:762–72. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3542-15.2016>.
- Jahn TR, Radford SE. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch Biochem Biophys* 2008;469:100–17. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.05.015>.
- Jaunmuktane Z, Mead S, Ellis M, Wadsworth JDF, Nicoll AJ, Kenny J, et al. Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 2015;525:247–50. <https://doi.org/10.1038/nature15369>.
- Jaunmuktane Z, Quaegebeur A, Taipa R, Viana-Baptista M, Barbosa R, Koriath C, et al. Evidence of amyloid- β cerebral amyloid angiopathy transmission through neurosurgery. *Acta Neuropathol* 2018;135:671–9. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1822-2>.
- Van Der Jeugd A, Hochgräfe K, Ahmed T, Decker JM, Sydow A, Hofmann A, et al. Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. *Acta Neuropathol* 2012;123:787–805. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0987-3>.
- Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L, Hoffmann R, Davies P. A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1997;69:2087–95. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69052087.x>.
- Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci* 2010;11:361–70. <https://doi.org/10.1038/nrn2808>.
- Jucker M, Walker LC. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 2013;501:45–51. <https://doi.org/10.1038/nature12481>.

- Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 1996;399:344–9. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01386-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01386-5).
- Kane MD, Lipinski WJ, Callahan MJ, Bian F, Durham RA, Schwarz RD, et al. Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci* 2000;20:3606–11.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325:733–6. <https://doi.org/10.1038/325733a0>.
- Karran E, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* 2016;139:237–52. <https://doi.org/10.1111/jnc.13632>.
- Kaufman SK, Sanders DW, Thomas TL, Ruchinskas AJ, Vaquer-Alicea J, Sharma AM, et al. Tau prion strains dictate patterns of cell pathology, progression rate, and regional vulnerability in vivo. *Neuron* 2016;92:796–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.055>.
- Kaufman SK, Thomas TL, Del Tredici K, Braak H, Diamond MI. Characterization of tau prion seeding activity and strains from formaldehyde-fixed tissue. *Acta Neuropathol Commun* 2017;5:41. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0442-8>.
- Kaufman SK, Del Tredici K, Thomas TL, Braak H, Diamond MI. Tau seeding activity begins in the transentorhinal/entorhinal regions and anticipates phospho-tau pathology in Alzheimer's disease and PART. *Acta Neuropathol* 2018;136:57–67. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1855-6>.
- Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2003;85:115–22. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01642.x>.
- Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI. Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem* 2012;287:19440–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346072>.
- Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 1985;42:1097–105. <https://doi.org/10.1001/archneur.1985.04060100083029>.
- Kidd M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature* 1963;197:192–3. <https://doi.org/10.1038/197192b0>.
- Kim D, Lim S, Haque MM, Ryoo N, Hong HS, Rhim H, et al. Identification of disulfide cross-linked tau dimer responsible for tau propagation. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/srep15231>.
- Kirkitadze MD, Condrón MM, Teplow DB. Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid β -protein fibrillogenesis. *J Mol Biol* 2001;312:1103–19. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4970>.
- Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, et al. Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:1087–95. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.11.1087>.
- Knowles TPJ, Waudby CA, Devlin GL, Cohen SIA, Aguzzi A, Vendruscolo M, et al. An analytical solution to the kinetics of breakable filament assembly. *Science* (80-) 2009;326:1533–7. <https://doi.org/10.1126/science.1178250>.
- Kollmer M, Close W, Funk L, Rasmussen J, Bsoul A, Schierhorn A, et al. Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. *Nat Commun* 2019;10.

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12683-8>.

- Komori T, Arai N, Oda M, Nakayama H, Mori H, Yagishita S, et al. Astrocytic plaques and tufts of abnormal fibers do not coexist in corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 1998;96:401–8. <https://doi.org/10.1007/s004010050911>.
- Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Del Alonso CA, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non- paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1993;268:24374–84.
- Korsakoff S. Etude médico-psychologique sur une forme des maladies de la mémoire. *Rev Philos France Let* 1889;28:501–30.
- Kovacs GG. Tauopathies. *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 145, Elsevier B.V.; 2018, p. 355–68. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00025-0>.
- Kovacs GG, Ferrer I, Grinberg LT, Alafuzoff I, Attems J, Budka H, et al. Aging-related tau astrogliopathy (ARTAG): harmonized evaluation strategy. *Acta Neuropathol* 2016a;131:87–102. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1509-x>.
- Kovacs GG, Lutz MI, Ricken G, Ströbel T, Höftberger R, Preusser M, et al. Dura mater is a potential source of A β seeds. *Acta Neuropathol* 2016b;131:911–23. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1565-x>.
- Kraus A, Saijo E, Metrick MA, Newell K, Sigurdson CJ, Zanusso G, et al. Seeding selectivity and ultrasensitive detection of tau aggregate conformers of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 2019;137:585–98. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1947-3>.
- Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 1986;122:1–5.
- De Lacoste MC, White CL. The role of cortical connectivity in Alzheimer’s disease pathogenesis: a review and model system. *Neurobiol Aging* 1993;14:1–16. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(93\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0197-4580(93)90015-4).
- Laferrière F, Maniecka Z, Pérez-Berlanga M, Hruska-Plochan M, Gilhespy L, Hock EM, et al. TDP-43 extracted from frontotemporal lobar degeneration subject brains displays distinct aggregate assemblies and neurotoxic effects reflecting disease progression rates. *Nat Neurosci* 2019;22:65–77. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0294-y>.
- Langer F, Eisele YS, Fritschi SK, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. Soluble a β seeds are potent inducers of cerebral β -amyloid deposition. *J Neurosci* 2011;31:14488–95. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3088-11.2011>.
- Le T V., Crook R, Hardy J, Dickson DW. Cotton wool plaques in non-familial late-onset Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1051–61. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.11.1051>.
- Legname G, Baskakov I V, Nguyen H-OB, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, et al. Biomedicine: synthetic mammalian prions. *Sci* 2004;305:673–5. <https://doi.org/10.1126/science.1100195>.
- Lesné S, Ming TK, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;440:352–7. <https://doi.org/10.1038/nature04533>.
- Lewis J, Dickson DW, Lin W, Chisholm L, Corral A, Jones G, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant Tau and APP. *Science* (80-) 2001;293:1487–91.
- Liao YUCJ, Lebo R V., Clawson GA, Smuckler EA. Human prion protein cDNA: Molecular cloning,

- chromosomal mapping, and biological implications. *Science* (80-) 1986;233:364–7. <https://doi.org/10.1126/science.3014653>.
- Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 1984;259:5301–5.
- Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, et al. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>.
- Lomakin A, Chung D, Benedek G, Kirschner D, Teplow D. On the nucleation and growth of amyloid β -protein fibrils: Detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1125–9.
- Luna-Muñoz J, Chávez-Macías L, García-Sierra F, Mena R. Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 2007;12:365–75. <https://doi.org/10.3233/JAD-2007-12410>.
- Magnani E, Fan J, Gasparini L, Golding M, Williams M, Schiavo G, et al. Interaction of tau protein with the dynactin complex. *EMBO J* 2007;26:4546–54. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601878>.
- Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol. Aging*, vol. 24, Elsevier Inc.; 2003, p. 1079–85. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.04.007>.
- Maphis N, Xu G, Kokiko-Cochran ON, Jiang S, Cardona A, Ransohoff RM, et al. Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain* 2015;138:1738–55. <https://doi.org/10.1093/brain/awv081>.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 2001;56:127–9. <https://doi.org/10.1212/WNL.56.1.127>.
- Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome: with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus induced spongiform encephalopathies. *Brain* 1981;104:559–88. <https://doi.org/10.1093/brain/104.3.559>.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:4245–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>.
- Mathews JD, Glasse R, Lindenbaum S. Kuru and cannibalism. *Lancet* 1968;2:449–52. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)90482-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(68)90482-0).
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, et al. Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science* (80-) 2010;330:1774. <https://doi.org/10.1126/science.1197623>.
- McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor J-P, Weintraub D, et al. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2017;89:88–100. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA work group* under the auspices of department of health and human services task force on alzheimer's disease. *Neurology* 1984;34:939–44. <https://doi.org/10.1212/wnl.34.7.939>.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of

- dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 2011;7:263–9. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Konrad Vbeyreuther, et al. Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999;46:860–6. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199912\)46:6<860::AID-ANA8>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199912)46:6<860::AID-ANA8>3.0.CO;2-M).
- McMackin D, Cockburn J, Anslow P, Gaffan D. Correlation of fornix damage with memory impairment in six cases of colloid cyst removal. *Acta Neurochir (Wien)* 1995;135:12–8. <https://doi.org/10.1007/bf02307408>.
- Medori R, Tritschler HJ, Leblanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* 1992;326:444–9. <https://doi.org/10.1056/NEJM199202133260704>.
- Melki R. How the shapes of seeds can influence pathology. *Neurobiol Dis* 2018a;109:201–8. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.03.011>.
- Melki R. Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)* 2018b;174:644–52. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.08.002>.
- Mercken M, Vandermeeren M, Lübke U, Six J, Boons J, Van de Voorde A, et al. Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol* 1992;84:265–72. <https://doi.org/10.1007/BF00227819>.
- Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, et al. Exogenous induction of cerebral β -amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* (80-) 2006;313:1781–4. <https://doi.org/10.1126/science.1131864>.
- Meyer-Luehmann M, Stalder M, Herzig MC, Kaeser SA, Kohler E, Pfeifer M, et al. Extracellular amyloid formation and associated pathology in neural grafts. *Nat Neurosci* 2003;6:370–7. <https://doi.org/10.1038/nm1022>.
- Mirbaha H, Chen D, Morazova OA, Ruff KM, Sharma AM, Liu X, et al. Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *Elife* 2018;7:e36584. <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>.
- Mirbaha H, Holmes BB, Sanders DW, Bieschke J, Diamond MI. Tau trimers are the minimal propagation unit spontaneously internalized to seed intracellular aggregation. *J Biol Chem* 2015;290:14893–903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652693>.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, et al. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991;41:479–86. <https://doi.org/10.1212/wnl.41.4.479>.
- Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, et al. National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. *Acta Neuropathol* 2012;123:1–11. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0910-3>.
- Myeku N, Clelland CL, Emrani S, Kukushkin N V., Yu WH, Goldberg AL, et al. Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nat Med* 2016;22:46–53. <https://doi.org/10.1038/nm.4011>.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol*

2012;71:362–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.

- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Mol Brain Res* 1986;1:271–80. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(86\)90033-1](https://doi.org/10.1016/0169-328X(86)90033-1).
- Nicholls SB, Devos SL, Commins C, Nobuhara C, Bennett RE, Corjuc DL, et al. Characterization of TauC3 antibody and demonstration of its potential to block tau propagation. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177914>.
- Nolte J. *The human brain : an introduction to its functional anatomy*. 2008.
- Nuvolone M, Hermann M, Sorce S, Russo G, Tiberi C, Schwarz P, et al. Strictly co-isogenic C57BL/6J-Prnp^{-/-} mice: A rigorous resource for prion science. *J Exp Med* 2016;213:313–27. <https://doi.org/10.1084/jem.20151610>.
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP^{Sc} 27-30 protein. *Cell* 1985;40:735–46. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90333-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90333-2).
- Ono K, Takahashi R, Ikeda T, Yamada M. Cross-seeding effects of amyloid β -protein and α -synuclein. *J Neurochem* 2012;122:883–90. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07847.x>.
- Otvos L, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 1994;39:669–73. <https://doi.org/10.1002/jnr.490390607>.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10962–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10962>.
- Papez JW. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry* 1937;38:725–43. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1937.02260220069003>.
- Paudel HK, Li W. Heparin-induced conformational change in microtubule-associated protein tau as detected by chemical cross-linking and phosphopeptide mapping. *J Biol Chem* 1999;274:8029–38. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8029>.
- Peeraer E, Bottelbergs A, Van Kolen K, Stancu IC, Vasconcelos B, Mahieu M, et al. Intracerebral injection of preformed synthetic tau fibrils initiates widespread tauopathy and neuronal loss in the brains of tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2015;73:83–95. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.08.032>.
- Peters F, Salihoglu H, Pratsch K, Herzog E, Pignoni M, Sgobio C, et al. Tau deletion reduces plaque-associated BACE1 accumulation and decelerates plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *EMBO J* 2019;38. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102345>.
- Petkova AT, Leapman RD, Guo Z, Yau WM, Mattson MP, Tycko R. Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science* (80-) 2005;307:262–5. <https://doi.org/10.1126/science.1105850>.
- Philipson O, Lord A, Lalowski M, Soliymani R, Baumann M, Thyberg J, et al. The Arctic amyloid- β precursor protein (A β PP) mutation results in distinct plaques and accumulation of N- and C-truncated A β . *Neurobiol Aging* 2012;33:1010.e1-1010.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.022>.
- Pickett EK, Herrmann AG, McQueen J, Abt K, Dando O, Tulloch J, et al. Amyloid- β and Tau cooperate

- to cause reversible behavioral and transcriptional deficits in a model of Alzheimer's disease 2019. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.044>.
- Plowey ED, Ziskin JL. Hippocampal phospho-tau/MAPT neuropathology in the fornix in Alzheimer disease: an immunohistochemical autopsy study. *Acta Neuropathol Commun* 2016;4:114. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0388-2>.
- Pooler AM, Polydoro M, Maury EA, Nicholls SB, Reddy SM, Wegmann S, et al. Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2015;3:14. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0199-x>.
- Poppek D, Keck S, Ermak G, Jung T, Stolzing A, Ullrich O, et al. Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: Influence of RCAN1 and oxidative stress. *Biochem J* 2006;400:511–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20060463>.
- Preuss U, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. The “jaws” model of tau-microtubule interaction examined in CHO cells. *J Cell Sci* 1997;110 (Pt 6):789–800.
- Probst A, Ulrich J, Heitz PU. Senile dementia of Alzheimer type: astroglial reaction to extracellular neurofibrillary tangles in the hippocampus. An immunocytochemical and electron-microscopic study. *Acta Neuropathol* 1982;57:75–9. <https://doi.org/10.1007/bf00688880>.
- Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982;216:136–44.
- Purro SA, Farrow MA, Linehan J, Nazari T, Thomas DX, Chen Z, et al. Transmission of amyloid- β protein pathology from cadaveric pituitary growth hormone. *Nature* 2018;564:415–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0790-y>.
- Qiang L, Sun X, Austin TO, Muralidharan H, Jean DC, Liu M, et al. Tau does not stabilize axonal microtubules but rather enables them to have long labile domains. *Curr Biol* 2018;28:2181–2189.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.045>.
- Qiang W, Yau WM, Lu JX, Collinge J, Tycko R. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature* 2017;541:217–21. <https://doi.org/10.1038/nature20814>.
- Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J, Podlisny MB, et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid β - protein by degradation. *J Biol Chem* 1998;273:32730–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32730>.
- Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, et al. Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C γ 1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 2008;283:18177–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709715200>.
- Ritchie DL, Adlard P, Peden AH, Lowrie S, Le Grice M, Burns K, et al. Amyloid- β accumulation in the CNS in human growth hormone recipients in the UK. *Acta Neuropathol* 2017;134:221–40. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1703-0>.
- Rosen RF, Ciliax BJ, Wingo TS, Gearing M, Dooyema J, Lah JJ, et al. Deficient high-affinity binding of Pittsburgh compound B in a case of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2010;119:221–33. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0583-3>.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 2006;38:24–6. <https://doi.org/10.1038/ng1718>.
- Rudenko L, Wallrabe H, Periasamy A, Siller K, Svindrych Z, Seward M, et al. Intraneuronal Tau

- misfolding induced by extracellular Amyloid- β oligomers. *J Alzheimer's Dis* 2019;71:1125–38. <https://doi.org/10.3233/JAD-190226>.
- Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001;411:810–3. <https://doi.org/10.1038/35081095>.
- Salvadores N, Shahnawaz M, Scarpini E, Tagliavini F, Soto C. Detection of misfolded A β oligomers for sensitive biochemical diagnosis of Alzheimer's disease. *Cell Rep* 2014;7:261–8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.031>.
- Sanders DW, Kaufman SK, DeVos SL, Sharma AM, Mirbaha H, Li A, et al. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 2014;82:1271–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>.
- Scheff SW, Price DA. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: Neocortex and hippocampus. *J Alzheimer's Dis* 2006;9:101–15. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-9s312>.
- Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ. Comparative epitope analysis of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease senile plaque neurites and neuropil threads. *Lab Invest* 1991;64:352–7.
- Schönheit B, Zarski R, Ohm TG. Spatial and temporal relationships between plaques and tangles in Alzheimer-pathology. *Neurobiol Aging* 2004;25:697–711. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.09.009>.
- Scoville W, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957;20:11–21. <https://doi.org/10.1136/jnnp.20.1.11>.
- Selden SC, Pollard TD. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J Biol Chem* 1983;258:7064–71.
- Sharma AM, Thomas TL, Woodard DR, Kashmer OM, Diamond MI. Tau monomer encodes strains. *Elife* 2018;7. <https://doi.org/10.7554/eLife.37813>.
- Shibata M, Yamada S, Ram Kumar S, Calero M, Bading J, Frangione B, et al. Clearance of Alzheimer's amyloid- β 1-40 peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2000;106:1489–99. <https://doi.org/10.1172/JCI10498>.
- Shin WS, Di J, Cao Q, Li B, Seidler PM, Murray KA, et al. Amyloid β -protein oligomers promote the uptake of tau fibril seeds potentiating intracellular tau aggregation. *Alzheimers Res Ther* 2019;11:86. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0541-9>.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, et al. Production of the Alzheimer amyloid β protein by normal proteolytic processing. *Science* (80-) 1992;258:126–9. <https://doi.org/10.1126/science.1439760>.
- Siahhaan V, Krattenmacher J, Hyman AA, Diez S, Hernández-Vega A, Lansky Z, et al. Kinetically distinct phases of tau on microtubules regulate kinesin motors and severing enzymes. *Nat Cell Biol* 2019;21:1086–92. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0374-6>.
- Sigurdsson B. Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics 1954;110:341–54.
- Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS, Brigham EF, et al. Secondary structure of amyloid β peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol* 1994;45:373–9.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccaveffo R, Davis D, et al. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 1999;402:537–40. <https://doi.org/10.1038/990114>.

- Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL. Evidence that β -amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* (80-) 1990;248:492–5. <https://doi.org/10.1126/science.1691865>.
- Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 1993;13:3136–42. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.13-07-03136.1993>.
- Snedecor G, Cochran W. *Statistical methods*. 7th edition. Ames: Iowa State University Press; 1980.
- Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 2013;12:609–22. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).
- Stahl N, Prusiner SB. Prions and prion proteins. *FASEB J* 1991;5:2799–807. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1916104>.
- Stancu IC, Cremers N, Vanrusselt H, Couturier J, Vanoosthuysse A, Kessels S, et al. Aggregated Tau activates NLRP3–ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo. *Acta Neuropathol* 2019;137:599–617. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-01957-y>.
- Stancu IC, Vasconcelos B, Ris L, Wang P, Villers A, Peeraer E, et al. Templated misfolding of Tau by prion-like seeding along neuronal connections impairs neuronal network function and associated behavioral outcomes in Tau transgenic mice. *Acta Neuropathol* 2015;129:875–94. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1413-4>.
- Stöhr J, Condello C, Watts JC, Bloch L, Oehler A, Nick M, et al. Distinct synthetic A β prion strains producing different amyloid deposits in bigenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:10329–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408968111>.
- Surmeier D, Obeso J, Halliday G. Parkinson's disease is not simply a prion disorder. *J Neurosci* 2017;37:9799–807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1787-16.2017>.
- Sweet WH, Talland GA, Ervin FR. Loss of recent memory following section of fornix. *Trans Am Neurol Assoc* 1959;84:76–82.
- Takeda S, Wegmann S, Cho H, DeVos SL, Commins C, Roe AD, et al. Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nat Commun* 2015;6:8490. <https://doi.org/10.1038/ncomms9490>.
- Tan R, Lam AJ, Tan T, Han J, Nowakowski DW, Vershinin M, et al. Microtubules gate tau condensation to spatially regulate microtubule functions. *Nat Cell Biol* 2019;21:1078–85. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0375-5>.
- Tardivel M, Bégard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A, Melki R, et al. Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol Commun* 2016;4:117. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>.
- Terry RD, Gonatas NK, Weiss M. Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *Am J Pathol* 1964;44:269–97.
- Terry RD, Hansen LA, Deteresa R, Da Vies P, Tobias H, Katzman R. Senile dementia of the alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987;46:262–8. <https://doi.org/10.1097/00005072-198705000-00003>.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 1991;30:572–80. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>.

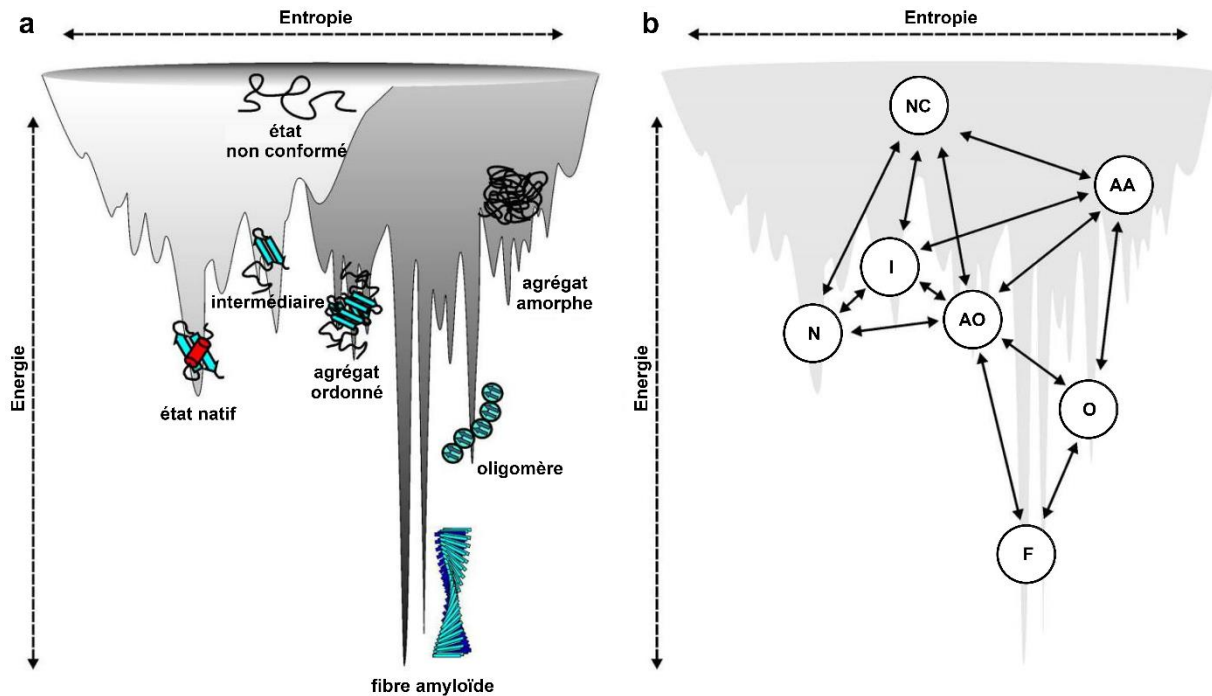
- Thal DR. Clearance of amyloid β -protein and its role in the spreading of Alzheimer's disease pathology. *Front Aging Neurosci* 2015;7. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00025>.
- Thal DR, Ghebremedhin E, Rüb U, Yamaguchi H, Del Tredici K, Braak H. Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002a;61:282–93. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.3.282>.
- Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 2002b;58:1791–800.
- Thal DR, Sassin I, Schultz C, Haass C, Braak E, Braak H. Fleecy amyloid deposits in the internal layers of the human entorhinal cortex are comprised of N-terminal truncated fragments of a β . *J Neuropathol Exp Neurol* 1999;58:210–6. <https://doi.org/10.1097/00005072-199902000-00010>.
- Thal DR, Schultz C, Deghani F, Yamaguchi H, Braak H, Braak E. Amyloid β -protein (A β)-containing astrocytes are located preferentially near N-terminal-truncated A β deposits in the human entorhinal cortex. *Acta Neuropathol* 2000;100:608–17. <https://doi.org/10.1007/s004010000242>.
- Thal DR, Walter J, Saido TC, Fändrich M. Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2015;129:167–82. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1375-y>.
- Tharp WG, Sarkar I. Origins of amyloid- β . *BMC Genomics* 2013;14:290. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-290>.
- Thierry M, Boluda S, Delatour B, Marty S, Seilhean D, Letournel F, et al. Human subiculo-fornico-mamillary system in Alzheimer's disease: Tau seeding by the pillar of the fornix. *Acta Neuropathol* 2019. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02108-7>.
- Thierry M, Marty S, Boluda S, Duyckaerts C. Alzheimer's senile plaque as shown by microcryodissection, a new technique for dissociating tissue structures. *J Neural Transm* 2017;124:685–94. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1718-7>.
- Utton MA, Noble WJ, Hill JE, Anderton BH, Hanger DP. Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and α -synuclein. *J Cell Sci* 2005;118:4645–54. <https://doi.org/10.1242/jcs.02558>.
- Vann SD, Aggleton JP. The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat Rev Neurosci* 2004;5:35–44. <https://doi.org/10.1038/nrn1299>.
- Vaquero-Alicea J, Diamond MI. Propagation of protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Biochem* 2019;88:785–810. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045049>.
- Vasconcelos B, Stancu IC, Buist A, Bird M, Wang P, Vanoosthuysen A, et al. Heterotypic seeding of Tau fibrillization by pre-aggregated A β provides potent seeds for prion-like seeding and propagation of Tau-pathology in vivo. *Acta Neuropathol* 2016;131:549–69. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1525-x>.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* (80-) 1999;286:735–41. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>.
- Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, et al. Microglia-derived ASC specks crossseed amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature* 2017;552:355–61. <https://doi.org/10.1038/nature25158>.
- Vergara C, Houben S, Suain V, Yilmaz Z, De Decker R, Vanden Dries V, et al. Amyloid- β pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta Neuropathol* 2019;137:397–412. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1953-5>.

- Viles JH, Klewpatinond M, Nadal RC. Copper and the structural biology of the prion protein. *Biochem Soc Trans* 2008;36:1288–92. <https://doi.org/10.1042/BST0361288>.
- Vincent I, Rosado M, Davies P. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *1996*;132:413–25.
- Virchow R. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Arch Für Pathol Anat Und Physiol Und Für Klin Med* 1854;6:135–8. <https://doi.org/10.1007/BF01930815>.
- Walker LC, Callahan MJ, Bian F, Durham RA, Roher AE, Lipinski WJ. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidosis in betaAPP-transgenic mice. *Peptides* 2002;23:1241–7.
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ. The oligomerization of amyloid β -protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry* 2000;39:10831–9. <https://doi.org/10.1021/bi001048s>.
- Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Krüger L, Irsen S, Tepper K, et al. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* 2017;12:5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>.
- Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 2016;17:5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>.
- Watts JC, Condello C, Stöhr J, Oehler A, Lee J, DeArmond SJ, et al. Serial propagation of distinct strains of A β prions from Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:10323–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408900111>.
- Webers A, Heneka MT, Gleeson PA. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol Cell Biol* 2020;98:28–41. <https://doi.org/10.1111/imcb.12301>.
- Weibel ER. *Stereological methods, vol. 1: practical methods for biological morphometry*. Acad Press Inc, London 1979;1:109. <https://doi.org/10.1002/jobm.19810210824>.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:1858–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>.
- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. Perivascular drainage of amyloid- β peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.*, vol. 18, 2008, p. 253–66. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00133.x>.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 1994;344:769–72. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)92338-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92338-8).
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004;25:1205–12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.005>.
- Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepijan S V, Chafai M, Kootar S, et al. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 2015;526:443–7. <https://doi.org/10.1038/nature14864>.
- Wilson DM, Bindert L 1. Free fatty acids stimulate the polymerization of Tau and Amyloid- β peptides: In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. vol. 150. 1997.
- Wisniewski HM, Sadowski M, Jakubowska-Sadowska K, Tarnawski M, Wegiel J. Diffuse, lake-like amyloid- β deposits in the paraventricular layer of the presubiculum in Alzheimer disease. *J*

- Neuropathol Exp Neurol 1998;57:674–83. <https://doi.org/10.1097/00005072-199807000-00004>.
- Wisniewski K, Jervis GA, Moretz RC, Wisniewski HM. Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. *Ann Neurol* 1979;5:288–94. <https://doi.org/10.1002/ana.410050311>.
- Wolozin BL, Pruchnicki A, Dickson DW, Davies P. A neuronal antigen in the brains of Alzheimer patients. *Science* (80-) 1986;232:648–50. <https://doi.org/10.1126/science.3083509>.
- Woolsey RM, Nelson JS. Asymptomatic destruction of the fornix in man. *Arch Neurol* 1975;32:566–8. <https://doi.org/10.1001/archneur.1975.00490500086012>.
- Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, et al. Small misfolded tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem* 2013;288:1856–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528>.
- Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, Rodriguez GA, Mrejeru A, Rilett K, et al. Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat Neurosci* 2016;19:1085–92. <https://doi.org/10.1038/nn.4328>.
- Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y. Diffuse plaques associated with astroglial amyloid β protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol* 1998;95:217–22. <https://doi.org/10.1007/s004010050790>.
- Ye L, Fritschi SK, Schelle J, Obermüller U, Degenhardt K, Kaeser SA, et al. Persistence of A β seeds in APP null mouse brain. *Nat Neurosci* 2015;18:1559–61. <https://doi.org/10.1038/nn.4117>.
- Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, Von Schroetter C, Garcia FL, et al. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:145–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.145>.
- Zempel H, Dennissen FJA, Kumar Y, Luedtke J, Biernat J, Mandelkow EM, et al. Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture. *J Biol Chem* 2017;292:12192–207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784702>.
- Zhao R, Hu W, Tsai J, Li W, Gan WB. Microglia limit the expansion of β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 2017;12. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0188-6>.
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJS, Hopkins R, Smith DW, et al. β -amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 1995;81:525–31. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90073-X).
- Ziegler-Waldkirch S, d'Errico P, Sauer J, Erny D, Savanthrapadian S, Loreth D, et al. Seed-induced A β deposition is modulated by microglia under environmental enrichment in a mouse model of Alzheimer's disease. *EMBO J* 2018;37:167–82. <https://doi.org/10.15252/embj.201797021>.

Annexes

Annexe 1 : Aspects énergétiques du repliement et de l'agrégation des protéines



Annexe 1 : Aspects énergétiques du repliement et de l'agrégation des protéines. a) La structure d'une protéine définit sa fonction et se forme séquentiellement selon trois à quatre niveaux d'organisation. La structure primaire correspond à la séquence d'acides aminés qui compose la chaîne polypeptidique. La structure secondaire se réfère aux remaniements tridimensionnels locaux de la protéine, les motifs structuraux secondaires les plus communs étant les hélices α et les feuillets β . Le repliement global de la protéine dans l'espace constitue sa structure tertiaire. Certaines protéines forment une sous-unité d'un complexe polypeptidique ; l'assemblage de ces sous-unités confère à l'unité fonctionnelle sa structure quaternaire, non traitée ici. Les protéines initialement **non conformées** doivent adopter une structure tertiaire donnée pour accéder à leur **état natif** et assurer leurs fonctions biologiques. L'acquisition de cette conformation fonctionnelle nécessite plusieurs étapes de conformations **intermédiaires**, permises par des **interactions intramoléculaires** (graphe gris clair). Ces intermédiaires conformationnels constituent des paliers énergétiques nécessaires pour accéder à l'état natif, représentés sur le graphe gris clair par des minima locaux. Certains intermédiaires, malconformés mais stables, doivent être réorganisés par des protéines chaperonnes ou, à défaut, dégradés par le complexe de contrôle qualité Ubiquitine-Protéasome. Une baisse de l'efficacité de ces systèmes de contrôle peut amener les intermédiaires partiellement repliés ou mal-replés à se stabiliser par le biais d'**interactions intermoléculaires** (graphe gris foncé), en particulier lorsqu'ils sont piégés par une barrière énergétique difficilement franchissable. Les interactions intermoléculaires sont favorisées par l'exposition de séquences d'acides aminés hydrophobes. Des assemblages de protéines homologues peuvent constituer des amorces de nucléation catalysant ces interactions intermoléculaires. L'agrégation protéique engendrée par ces interactions intermoléculaires conduit, selon la conformation des protéines, à la formation d'**agrégats amorphes**, d'**agrégats ordonnés**, d'**oligomères** ou de **fibres amyloïdes** hautement structurées, dans lesquelles des feuillets β s'assemblent perpendiculairement à l'axe longitudinal de la fibre (structures dites « *cross- β* »). En conditions pathologiques, certaines protéines peuvent ainsi s'auto-agréger et constituer différents types d'assemblages, dont des fibres amyloïdes très stables sur le plan thermodynamique (e.g. A β , Tau, Prp). Il est à noter que la formation de fibres amyloïdes n'est pas limitée à un petit nombre de séquences protéiques, mais est possible pour de nombreuses chaînes polypeptidiques, sinon toutes, dans des conditions appropriées (Chiti et al., 1999). b) La transition d'un état conformationnel, ou d'un type d'assemblage, à l'autre est dynamique, pas toujours linéaire et plus ou moins probable selon l'énergie requise. NC : état non conformé ; I : intermédiaire ; N : état natif ; AO : agrégat ordonné ; AA : agrégat amorphe ; O : oligomère ; F : fibre amyloïde.

D'après Hartl et Hayer-Hartl, 2009 et Jahn et Radford, 2008.

Annexe 2 : Tauopathies

Caractéristiques	Maladie							
	MA	MGA	DCB	PSP	MPi	TGG	ARTAG	ETC
Biochimie								
3R + 4R	+							+
4R >>		+	+	+		+	+	
3R >>					+			
Bandes 60, 64, 68, (72) kDa	+							+
Bandes 64, 68 kDa		+	+	+		+	+	
Bandes 60, 64 kDa					+			
Cytopathologie								
DNF corticales	+							+
DNF sous-corticales				+				+
Marquage CN diffus	+	+	+	+		+		
Corps de Pick (3R+)					+			
Inclusions CN sphériques (4R+)			+			+		
Fibres tortueuses	+		+	+				
Grains		+	+					
Corps spiralés oligodendrocytaires		+	+	+				+
Inclusions oligodendrogiales globulaires						+		
Inclusions astrogliales globulaires						+		
Astrocytes ramifiés					+			
Touffes astrocytaires				+				
Plaques astrocytaires			+					
Astrocytes épineux				+			+	+
Astrocytes granulaires diffus		+					+	+

Annexe 2 : Principales caractéristiques des tauopathies primaires, de l'astrogliopathie liée à l'âge et de l'encéphalopathie traumatique chronique. MA, maladie d'Alzheimer ; MGA, maladie des grains argyrophiles ; DCB, dégénérescence cortico-basale ; PSP : paralysie supranucléaire progressive ; MPi, maladie de Pick, TGG, tauopathie gliale globulaire ; ARTAG, astrogliopathie liée à l'âge (« *aging-related Tau astroglipathy* ») ; ETC, encéphalopathie traumatique chronique ; DNF, dégénérescences neurofibrillaires ; CN, cytoplasme neuronal. Seuls les éléments pertinents sur le plan diagnostique sont indiqués, mais d'autres observations et une superposition de ces caractéristiques sont possibles pour l'ensemble de ces pathologies.

D'après Kovacs, 2018.

Publications

Alzheimer's senile plaque as shown by microcryodissection, a new technique for dissociating tissue structures

Manon Thierry^{1,2} · Serge Marty¹ · Susana Boluda^{1,2} · Charles Duyckaerts^{1,2} 

Received: 18 October 2016 / Accepted: 27 March 2017
© Springer-Verlag Wien 2017

Abstract Extracellular accumulation of A β peptides and intracellular aggregation of hyperphosphorylated tau proteins are the two hallmark lesions of Alzheimer disease (AD). The senile plaque is made of a core of extracellular A β surrounded by phospho-tau positive neurites. It includes multiple components such as axons, synapses, glial fibers and microglia. To visualize the relationships of those elements, an original technique was developed, based on the dilation of interstitial water during freezing. Samples of neocortex, hippocampus and striatum were taken from formalin-fixed brains (one control case; three cases with severe Alzheimer disease). The samples were subjected to various numbers of freezing/thawing cycles (from 0 to 320) with an automated system we devised. The samples were embedded in paraffin, cut and stained with haematoxylin-eosin or immunostained against A β , phospho-tau, and antigens enriched in axons, synapses, macrophages or astrocytes. Microcryodissection induced the dissociation of tissue components, especially in the grey matter where the neuropil formed an oriented “mesh”. The size of the empty spaces separating the fiber bundles and cells increased with the number of cycles. The amyloid core of the senile plaque separated from its neuritic crown at around 300 freezing/thawing cycles. The dissected core remained

associated with macrophages containing A β in their cytoplasm. Phospho-tau positive axons were distinctly seen projecting from the neuritic crown to the isolated amyloid core, where they ended in large synapses. The microcryodissection showed astrocytic processes stuck directly to the core. The original method we developed—microcryodissection—helped understanding how histological components were assembled in the tissue.

Keywords Microcryodissection · Klingler's method · Senile plaque · Alzheimer

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized by extracellular accumulation of β -amyloid peptides (A β) and intraneuronal aggregation of hyperphosphorylated tau proteins (HP-tau). Tau and A β accumulation occurs in the senile plaque, a complex lesion that is one of the hallmarks of AD pathology. The senile plaque is made of an A β deposit, eventually concentrated in an amyloid core, surrounded by a phospho-tau positive neuritic crown (Duyckaerts et al. 2009). Astrocytic processes, axons, synapses, macrophages and possibly dendrites are also involved in the complex structure of the senile plaque. The relationships of those components are difficult to disentangle. In this study, we developed a new and original technique to dissociate the senile plaque (and more generally, histological structures). The method, microcryodissection, is based on the dilation of interstitial water obtained by freezing the tissue [inspired by Klingler's method (Ludwig and Klingler 1956)]. Water is excluded from the lipid-rich membranes and accumulates within the space separating them. The dilation of water, during the freezing stage, is followed by thawing during which water

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00702-017-1718-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Manon Thierry
manon.thierry@icm-institute.org

¹ Alzheimer's and Prion Diseases Team, Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière, CNRS UMR 7225, INSERM 1127, UPMC UM75, Paris, France

² Laboratoire de Neuropathologie Raymond ESCOUROLLE, Paris, France

accumulates in the holes left by the contraction of water when switching from solid to liquid state. Repeating the cycles gradually dissects the hydrophobic, lipid rich structures, from the water-containing interstitium (Fig. 1).

Materials and methods

Cases

Four brains were investigated. They had been collected in a brain donation project and stored in the national brain bank NeuroCEB (bioresource research impact factor number BRIF BB-0033-00011). Case 1 (control) was a 92 years old woman with no A β pathology and only a few tau positive neurites and neurofibrillary tangles in the entorhinal cortex and anterior hippocampus (Braak neurofibrillary stage III, Thal amyloid phase 0 (Braak and Braak 1991; Thal et al. 2002)). Cases 2, 3 and 4 were a woman and two men of 73, 62 and 68 years of age, respectively, with severe AD lesions (Braak VI, Thal 5).

Preparation of the human samples

The neocortex (area 22), hippocampus and striatum were re-sampled from brains which had been stored in buffered formalin 10% (formaldehyde 4%) for 1, 2, 3 or 5 years. The

samples, with an area of approximately 2 cm², and a thickness of 3 mm, were submitted to freezing/thawing cycles induced by an automated system developed in this laboratory (supplementary Fig. S1). The device was made of a Peltier thermoelectric cooler (TEC1-12706, Hebei I.T., Shanghai, China) powered by a 12 V, 5 A supply and cooled by a heatsink with a fan taken from a used power supply of a computer. The fan was powered through a USB plug. The circuit was interrupted by a relay connected with a computer (USB one relay, KMtronic Ltd, Bulgaria). A batch file was programmed to ensure a cycle of 700 s on (to freeze the sample) and 300 s off (to thaw it and to cool the device). One sample of neocortex (case 2) was sectioned into nine subsamples. The subsamples were subjected to an increasing number of freezing/thawing cycles ($n = 0, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320$). After establishing that the best results were obtained with 320 freezing/thawing cycles (Fig. 2), all the other samples (cases 1, 3 and 4) were subjected to at least 300 cycles, i.e. alternative freezing and thawing for 5000 min or 3 days and a half. The microcryodissected samples were embedded in paraffin. Histologic sections were cut from the block at a thickness of 3 μ m.

Preparation of the mouse samples

Three PS1 mice (used as controls of APPxPS1 mice), devoid of plaques were used to test the possibility of a

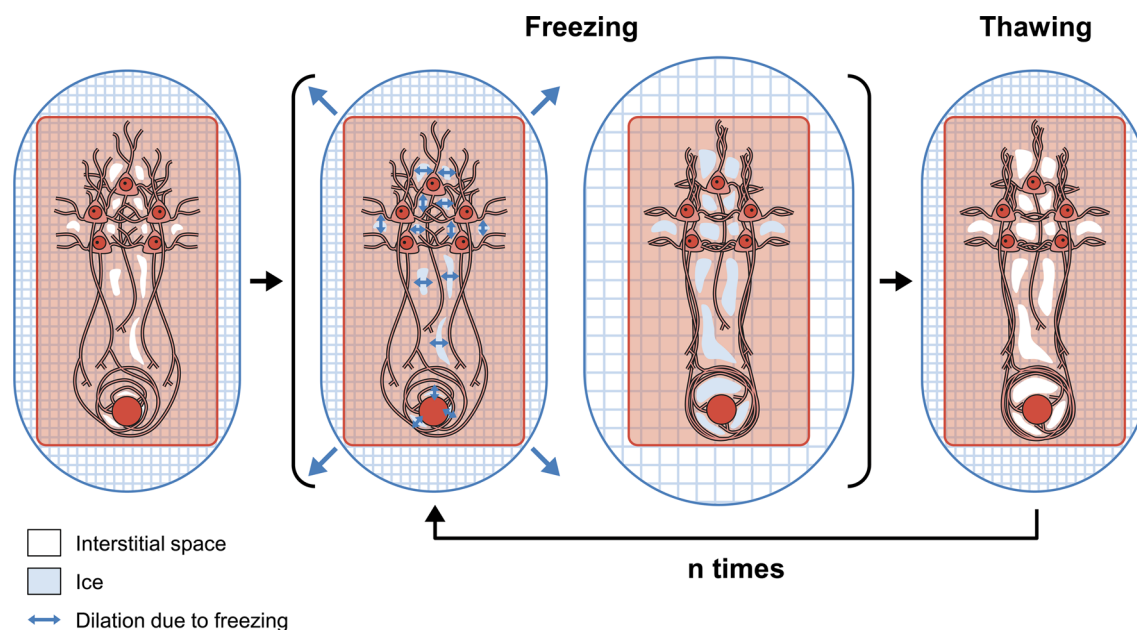


Fig. 1 Diagram representing the principle of microcryodissection. The *blue grid* represents water in contact with the brain sample (*red rectangle*). Water does not penetrate the lipid-rich membranes, and fills the interstitium. The dilation of water caused by freezing (*blue arrows*) induces the expansion of interstitial spaces (*ice in blue*) within the tissue components. During thawing, more water

accumulate in the enlarged interstitial spaces. Water is represented in *white*. Successive freezing/thawing cycles amplify the process (≥ 300 cycles in this study). Five neurons and a senile plaque containing an amyloid core (*red circle*) surrounded by a neuritic crown made of axons are represented within the brain section, surrounded by an interstitial space

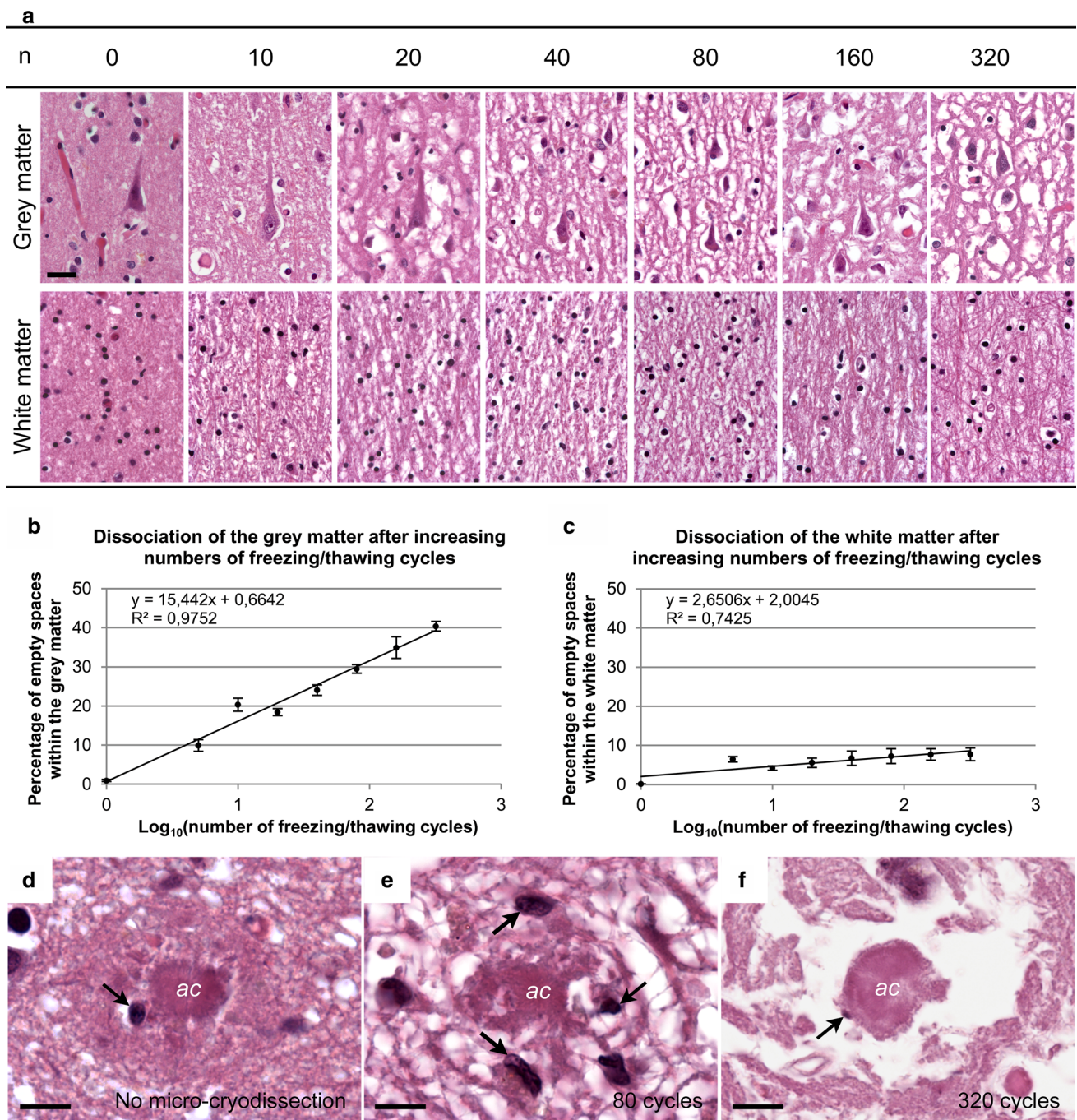


Fig. 2 Effects of microcryodissection at various number of freezing/thawing cycles. **a** Human brain. Haematoxylin–eosin stain. Scale bar 20 μ m. Aspects of the neocortex (upper row) or white matter (lower row) after n freezing/thawing cycles (n from 0 to 320). The effects of microcryodissection in the subcortical white matter were limited. In the neuropil, fibers were best dissociated after 80 cycles. Beyond that value, fibers tended to aggregate into oriented fascicles that formed an organized mesh. **b** and **c** Means of the proportion of empty spaces within the grey matter (**b**) or within the white matter (**c**), as a function

of $\log_{10}(n)$, n being the number of freezing/thawing cycles. The means are obtained from six microscopic fields, observed at a $\times 10$ magnification. The equation of the linear regression is given, as well as the coefficient of determination. **d–f** Human brain. Haematoxylin–eosin stain. Scale bar 8 μ m. Senile plaques observed without microcryodissection (**d**), after 80 cycles (**e**) or after 320 cycles (**f**). The amyloid core (*ac*) of the senile plaque was best dissociated from its neuritic crown after 320 cycles. Macrophages (arrows) appeared to be associated with the amyloid core

different reactivity of rodent tissue to cryodissection. Brains were formalin fixed by immersion. Sagittally sectioned hemispheres were subjected to 80 or 320

freezing/thawing cycles. The samples were embedded in paraffin, sectioned at a 3 μ m thickness, deparaffinized, and stained with haematoxylin–eosin.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was performed with the automated Nexes station (Roche Ventana Medical Systems)—except for A β IHC which required a longer incubation period, not possible to achieve with the automated system. Deparaffinized and rehydrated sections were pre-treated, and then incubated with the primary antibodies (see the supplementary table for details). Primary antibodies directed against phospho-tau (AT8), myelin basic proteins (MBP), synaptophysin, CD68, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ubiquitin were detected with the *ultraView* Universal DAB kit (Ventana Medical Systems), according to the procedure XT *ultraView* DAB v3 summarized in the supplementary table. The kit includes secondary antibodies (goat anti-mouse IgG, anti-mouse IgM and anti-rabbit) conjugated with horseradish peroxidase polymers. The addition of H₂O₂ and DAB leads to the formation of a brown precipitate. For the double labeling with the anti-phospho-tau AT8 and anti-A β 6F3D or with anti-MBP and anti-NF, two rounds of immunolabeling, separated by washing and heat denaturation, were performed. During the first round, the first primary antibody was labeled with secondary antibodies coupled with peroxidase that oxidized DAB into a brown precipitate. The sections were then incubated with the second primary antibody, revealed by the *ultraView* Universal Alkaline Phosphatase Red detection kit (Ventana Medical Systems), used according to the XT IHC Double Staining uDAB-uRed v3 procedure summarized in the supplementary table. The kit includes secondary antibodies (goat anti-mouse IgG, anti-mouse IgM and anti-rabbit) conjugated with alkaline phosphatase polymers. The addition of naphthol and Fast Red leads to the formation of a red precipitate. The anti-A β 6F3D IHC was performed manually following the steps summarized in the supplementary table, using DAB for detection (ChemMate Dako detection kit). Sections were counterstained with Harris haematoxylin.

Assessment of the volume change of the sample related to freezing–thawing

Samples were left on graph pictures before and after the series of freezing–thawing cycles. Pictures were taken. The main axes of the samples were manually measured on the pictures.

Quantification of the increase in empty space caused by microcryodissection

The nine neocortical subsamples of case 2 were subjected to an increasing number of freezing/thawing cycles (see above). The samples were embedded in paraffin, and cut at

3 μ m. The deparaffinized and rehydrated sections were stained with haematoxylin–eosin. For each section, 12 pictures were taken in the grey matter (n fields = 6) and in the white matter (n fields = 6). The expansion of the empty spaces was assessed using Image J. Pictures were converted into 8-bit images and binarized using the black and white mode, after setting the threshold at a level where the whole picture appeared white except the empty spaces that were shown in black. The proportion of black (empty spaces) over white pixels (all other structures) was then calculated. Blood vessels were excluded from the analysis, to avoid bias due to the presence of Virchow–Robin spaces. The superficial layers (I and II) of the cortex were also excluded from the quantification, since a spongiosis likely due to Alzheimer’s disease could be observed in the unprocessed sample. We tested several types of functions with the aim of fitting the observation points to a theoretical curve. The goodness of fit was evaluated by the coefficient of determination R^2 .

Electron microscopy

Three samples from the frontal cortex were removed from a formalin-fixed brain (case 3). The samples were submitted to the 80 or 320 freezing/thawing cycles and compared to a sample that was commonly processed. Each sample was sliced into 200 μ m sections using a vibratome (Leica, Vienna, Austria). For each condition, small areas of $1 \times 1 \times 0.2$ mm³ were taken from the grey matter, where the plaques were more abundant, and collected in Phosphate Buffered Saline (PBS). After several washes in Phosphate Buffer (PB), they were transferred into a 1% osmium solution for 1 h. After several washes in water, they were stained “en bloc” with a 5% uranyl acetate solution for 30 min. After several washes, the samples were dehydrated in graded ethanol followed by acetone. They were incubated in 50% acetone–50% epon overnight, followed by epon for 2 h, before being embedded. Sections were cut using a Leica EM UC7 (Leica, Vienna, Austria). For light microscopy, 0.5 μ m-thick semi-thin sections were collected on glass slides. For electron microscopy, 70 nm-thick ultrathin sections were collected on copper grids. Ultrathin sections were analyzed with a Hitachi HT 7700 electron microscope (Elexience, Verrieres le Buisson, France) and a 2048 \times 2048 AMT XR41-B CCD camera (Elexience).

Results

Change in the volume of the sample and of the empty spaces present in the section

There was no macroscopic change in the macroscopic volume of the samples whatever the number of freezing/

thawing cycles. The empty spaces contained in the section increased with the number of cycles. Curve fitting approximation indicated that the percentage of space occupied by the empty spaces in the grey matter increased with the number of cycles according to the following equation: $E = a \times \log_{10}(n) + b$ ($r = 0.99$; coefficient of determination $R^2 = 0.9752$); E being the empty areas found in the section, expressed as a percentage, and n being the number of cycles. The constant a is 15.442 and the constant b is close to zero (0.664). For the control (no freezing), the Y value for $n = 0$ was taken as zero to avoid the singularity of $\log(0)$. In practice, the equation means that the area occupied by empty spaces is increased twofold from 10 to 100 cycles and threefold from 10 to 1000. Similar results were observed in the white matter, with $a = 2.651$ and $b = 2.005$. ($r = 0.86$; coefficient of determination $R^2 = 0.7425$). Comparison of the slopes for the grey (15.442) and the white (2.651) matter indicates that the expansion is nearly six times larger in the former (Fig. 2).

Effects of microcryodissection on the tissue components

As expected from the previous paragraph, dissociation of the tissue was particularly marked in the grey matter. Dissection of the axons was limited in the white matter, but sufficient to show the orientation of the fiber fascicles. The dissection of the fibers of the grey matter was best at 80 freezing/thawing cycles, but more homogeneous at 320 cycles where fibers gathered into an oriented “mesh”. Results were similar in the mouse brain (supplementary Fig. S2). In the human, the amyloid core of the senile plaque separated best from the crown at 320 cycles—a number of cycles which was thus chosen to study the senile plaque (Fig. 2). The extent of the dissection was inversely proportional to the abundance of myelinated fibers. In the lenticular nucleus, for instance, the grey matter of the putamen (Pu) was more dissociated than the pallidum (Pa) enriched in myelinated fibers. Neurons, glial cells and vessels were well-preserved and often separated from the other components of the tissue. The cell bodies were surrounded by an empty space, but were not dilacerated. In the dentate gyrus, the dissociation of the cell bodies and of the dendrites from the surrounding neuropil was particularly striking in the control cases (Fig. 3). The neuropil formed a lace-like structure, a “mesh”, made of oriented fiber fascicles separated by holes. The fascicles of fibers, making up the mesh, were mainly axonal near the white matter. In the subpial region, the mesh was mostly made of dendritic or astrocytic fibers. Astrocytic feet, isolated by microcryodissection, were observed in contact with capillaries in the

Virchow–Robin spaces (Fig. 4). Several years of fixation did not modify the results.

Senile plaques in the cortex

In the senile plaques, the A β positive amyloid core was separated from the neuritic crown after a series of freezing/thawing cycles. CD68 positive phagocytic cells were nearly always seen in contact with the core. Their cytoplasm was demarcated from the neuritic crown and often contained A β immunoreactive material. The cytoplasmic location of some A β aggregates could be better ascertained on the isolated macrophage separated from its surrounding by the dissection than in the unprocessed tissue. Some of that material was Congo red positive. The phospho-tau positive processes of the crown included thin neurites, devoid of spines, projecting to the core where they ended as dilated boutons that were labeled with anti-NF and anti-synaptophysin antibodies. The pathway followed by the tau positive axons from the periphery to the synaptic contact with the amyloid core could be uniquely identified after the microdissection. Astrocytic processes wrapped the core of the senile plaques. The direct contact of the glial processes with the amyloid core was beautifully illustrated in the microcryodissected plaque, while it was obscured by the neuritic crown in the unprocessed tissue (Fig. 5; supplementary Fig. S3).

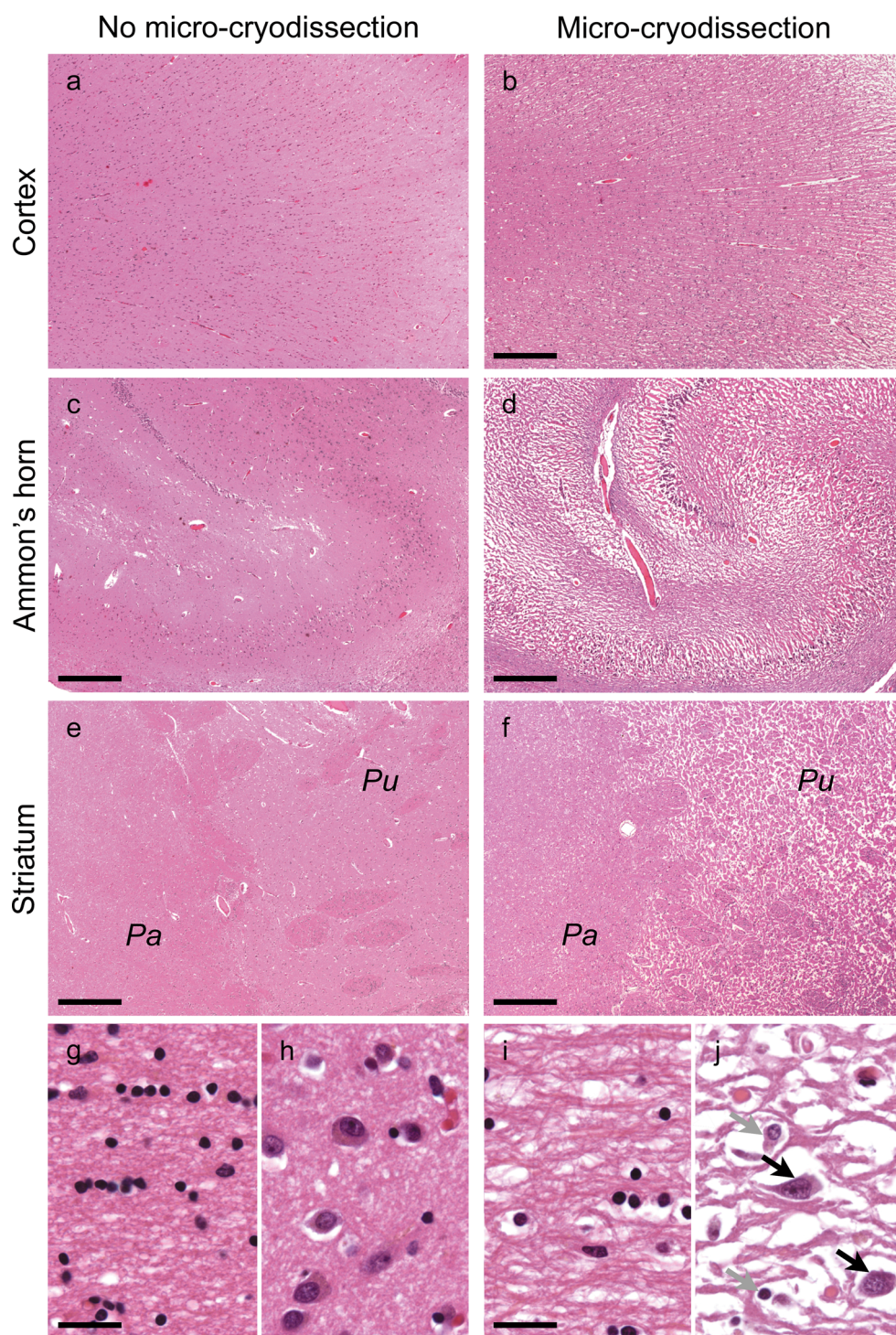
Electron microscopy

Without cryodissection, the core of the senile plaque, the macrophages, the neuritic crown, the macrophages and the glial processes were imbricated. At 80 cycles, a space between the amyloid core and the dystrophic neurites could be observed. The aspect of the plaque constituents was preserved. At 300 freezing/thawing cycles, senile plaques could be seen neither in semi-thin sections nor at the ultrastructural level. The senile plaque probably detached from the section. When the section is too thin, the tissue probably loses its cohesion as a consequence of the large proportion of empty spaces. Of note, the content of the perikaryon of isolated neurons could still be seen with some details. The vessels were also clearly separated from the adjacent neuropil (supplementary Fig. S4).

Diffuse A β deposits in the striatum

A β deposits were almost only of the diffuse type in the putamen. Microcryodissection did not dissociate the diffuse deposits themselves but the tissue in which they had developed: the elements of the striatum were separated in the same way whether or not diffuse A β deposits

Fig. 3 Effects of microcryodissection at 300 freezing/thawing cycles. Human brain. Haematoxylin–eosin stain. Sections of neocortex (**a**, **b**), Ammon's horn (**c**, **d**) and striatum (**e**, **f**) without (*left column*) or with (*right column*) microcryodissection. *Pa pallidum*, *Pu putamen*. Aspect of the white matter (**g**, **i**) and grey matter (**h**, **j**) in the neocortex, without (*left column*) or with (*right column*) microcryodissection. The grey matter was better dissociated than the white matter: some cells were completely separated from the adjoining neuropil and were easily identified and analyzed (*black arrows* neurons, *grey arrows* glial cells). **a–f** scale bar 400 μ m, **g–j** scale bar 20 μ m

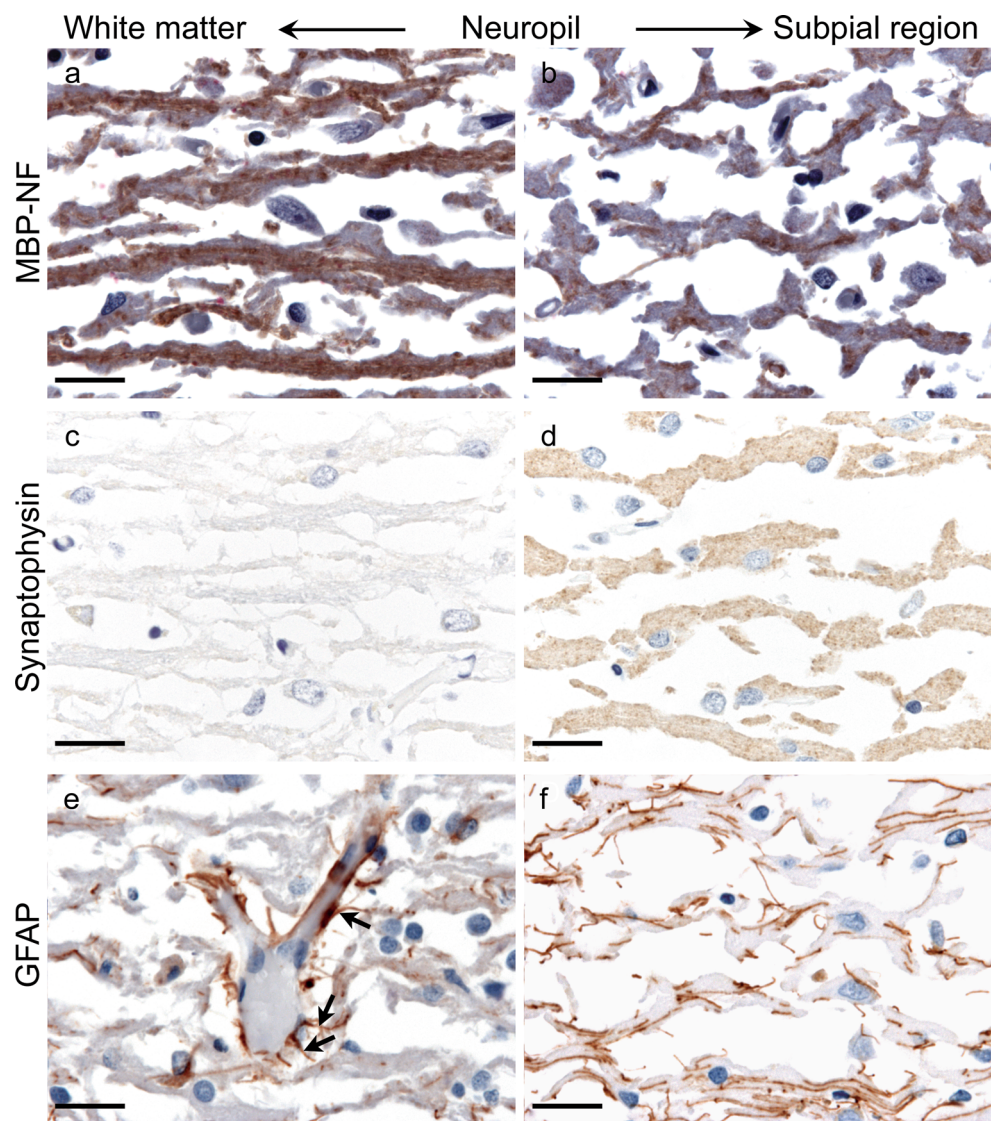


were present. Neuronal and glial cells were only exceptionally observed around or within the diffuse deposits; A β immunoreactivity was never found in their cytoplasm. The smallest deposits of A β were granular, ovoid in shape and located in the mesh, most often at a distance of any cell body (supplementary Fig. S5).

Tau pathology

In areas where neuropil threads were abundant, and specifically in the crown of the senile plaque, the tau positive neurites were fragmented, and dot-like. Continuous fibers were rarer than in tissues that had not been

Fig. 4 Characterization of the lace-like structure obtained by microcryodissection. **a–f** Double immunolabelling against myelin basic protein (MBP)/neurofilament (NF). MBP is labeled in brown (precipitated DAB) and NF in red (Fast Red) (**a, b**), anti-synaptophysin (**c, d**) and anti-GFAP (**e, f**) in the neuropil near the white matter (**a, c, e**) or in the subpial region (**b, d, f**) after microcryodissection. In the neuropil near the white matter, the mesh was mostly made of axons (**a, c, e**). Some astrocytic feet (*arrows*) were observed in contact with isolated vessels. In the neuropil near the subpial region, the mesh was mainly composed of dendrites and astrocytic processes (**b, d, f**). Human cerebral cortex, scale bar 20 μ m



cryodissected. Similar aspects of fragmented processes were observed after NF immunohistochemistry. By contrast, some ubiquitin-positive fibers remained continuous. Tau positive fibers or dots resembling synapses were seen in direct contact with the unlabeled cell body of some neurons or, in other instances, with the amyloid core of the plaque itself. A few tau positive dots could also be seen within the core (supplementary Fig. S6).

Discussion and conclusions

The original technique that we developed—microcryodissection—made use of the dilation of freezing water to dissociate the tissue. The grey matter dissociated into a network of fiber fascicles, alternating with empty spaces in which the cell bodies could usually be found. The proportion of area occupied by those empty spaces increased

as the log of the number of cycles. According to Delesse principle (Weibel 1979), the proportion of area on a section is equal to the proportion of volume in three dimensions: the logarithmic relationship remains true for the volume. Surprisingly, the total volume of the microcryodissected samples remained unchanged. The formalin fixation, which induces the development of covalent bonds within the tissue, may act as a limiting factor to the expansion forces. The foci of synchronous expansion, constituted by extracellular empty spaces, may also counteract each other and prevent a general increase of the sample volume. The absence of general expansion and the synchronous dilation of empty spaces may explain why dissociated fibers tended to aggregate into fascicles that appeared wider with the increase in the number of cycles. The fiber dissociation was the finest at 80 cycles. With the increase in the volume of empty spaces, the neuritic and glial processes aggregated in large fascicles that finally formed a mesh. The mesh did not

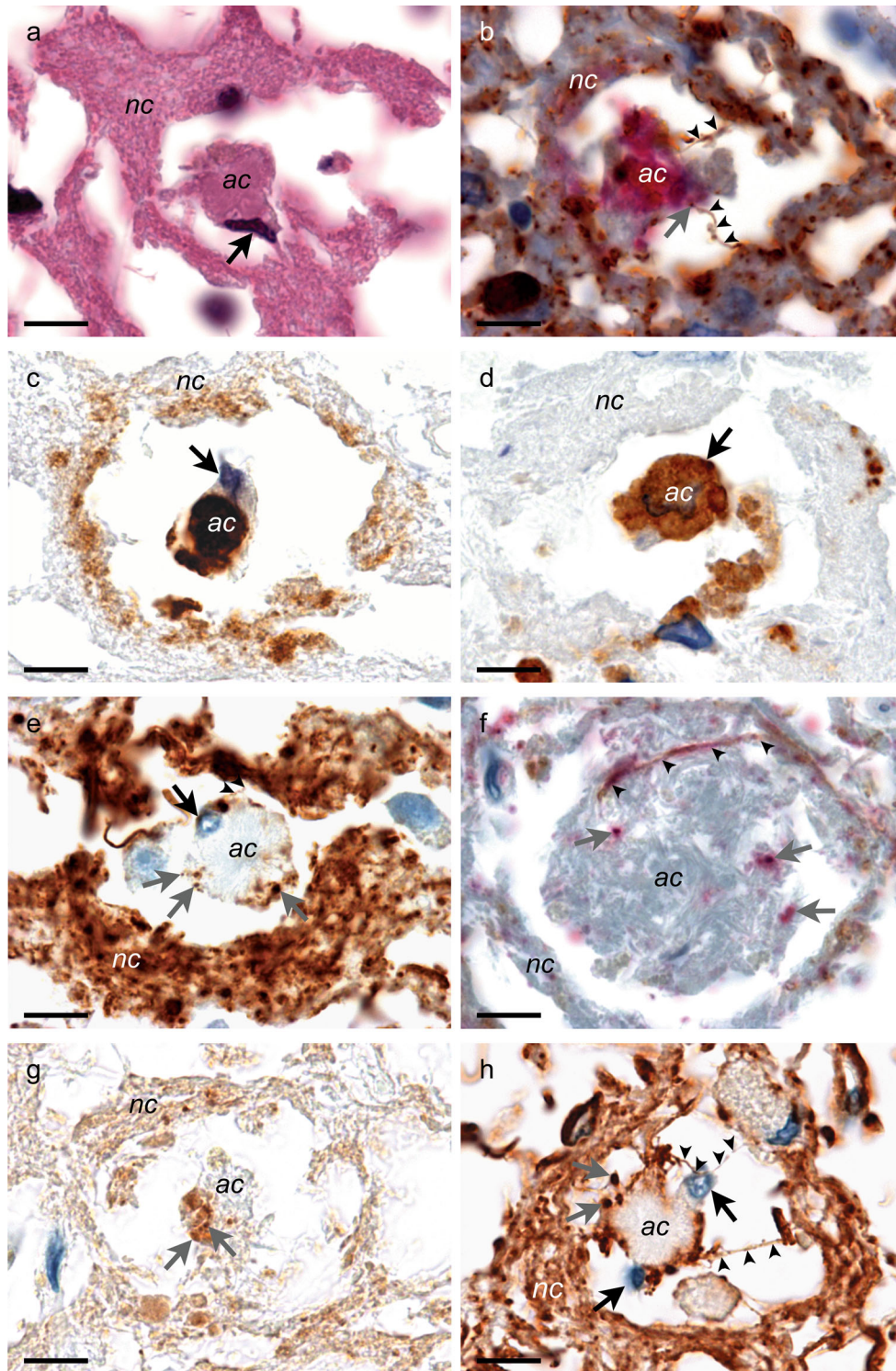


Fig. 5 Microcryodissection of the senile plaque in the cortex. **a–h** Senile plaque. All the pictures were obtained after microcryodissection. Cortex, human brain, scale bar 8 μm . **a** Haematoxylin/eosin stain. The neuritic crown (“nc” area) surrounded the amyloid core (“ac” area), associated with a macrophage (*arrow*). Those elements were dissociated by microcryodissection: the nucleus of the macrophage was stuck to the amyloid core while the crown had been detached from it. **b** Double immunostaining of phospho-tau (AT8) in brown and A β (6F3D) in red. The *arrow heads* point to tau-positive neurites oriented toward the amyloid core. **c** A β immunohistochemistry (6F3D). Here again, the macrophage was attached to the amyloid core. The *black arrow* points to its nucleus. Its cell body was filled with A β immunoreactive material. **d** CD68 immunohistochemistry. The cytoplasm of the macrophages (*black arrow*) was labeled. Unexpectedly, the core of the senile plaque, separated from the neuropil was also positive. **e** Phospho-tau immunohistochemistry (AT8). The neuritic crown, made of numerous immunoreactive neuropil threads, surrounded the amyloid core. Some thin AT8 positive neurites devoid of any spine (*arrowheads*) were sometimes oriented to the core, where immunoreactive synapse-like dots were observed (*grey arrows*). The nucleus of a macrophage is seen attached to the core (*black arrow*). **f** Double labeling myelin basic protein (MBP) in brown and neurofilament (NF) in red. A naked axon (devoid of MBP) curved around the amyloid core (*arrow heads*); several NF positive profiles are seen within the core (*grey arrows*). **g** Anti-synaptophysin immunohistochemistry: the whole plaque was diffusely labeled. Immunoreactive dots were seen in the crown, as well as in contact with the amyloid core (*grey arrows*). **h** GFAP immunohistochemistry. The plaque was wrapped in GFAP positive fibers. Some fibers were oriented toward the core (*arrowheads*). Macrophages were associated to the amyloid core (*black arrows*)

form at random, but followed the orientation of the axons and dendrites present in the neuropil. The pattern of the mesh also depended on the cytoarchitecture. The integrity of the dissociated neuronal, glial and endothelial cells was preserved, at least at the light microscopy level, likely because the cytosolic concentration of diluted solutes prevented freezing at the temperatures reached by the Peltier module ($-10/-15\text{ }^{\circ}\text{C}$). In comparison with the results observed in the grey matter, the dissociation of the white matter was limited (the increase in the volume of empty spaces was nearly six times smaller). A smaller volume of interstitial water in the highly hydrophobic white matter may explain that observation.

Microcryodissection of the senile plaque dissociated the A β positive amyloid core from the phospho-tau positive neuritic crown at around 300 cycles. The microglial cells, the axonal processes and the astrocytic wrapping were clearly demarcated. The A β positive amyloid core was nearly always associated with active phagocytic cells, the cytoplasm of which sometimes contained A β , in some cases Congo red positive. Microcryodissection showed distinctly the adhesion of the microglial cell to the amyloid core by separating the elements of the plaques and improved the resolution of the observation in that respect. It has been suggested that microglia are responsible for the

maturation of an initially diffuse deposit into an amyloid core through a process involving endocytosis (Frackowiak et al. 1992). The phospho-tau positive neuritic crown, mainly composed of axons (Schmidt et al. 1991), seemed to project to the center of the plaque, where dystrophic axons ended and several large synapses were observed. The presence of synapses in the neuritic crown was already mentioned in one of the first ultrastructural descriptions of the senile plaque (Gonatas et al. 1967), but their role in its development is not known. Astrocytic processes were also present within the neuritic crown. The presence of a few axonal or astrocytic fibers reaching the core after having crossed the empty space surrounding it could have been considered as a random consequence of the microdissection. The regularity of that observation suggests that it uncovers an intrinsic property of the plaque. Altogether, microcryodissection could help uncover the dynamic interactions between the neuritic crown and the amyloid core.

It has been suggested that extracellular A β was produced by neuronal secretion, but diffuse deposits were usually found at a distance from any cell body, making the somatic secretion of A β unlikely. More probably, A β is directly secreted by the axonal ending (Braak and Del Tredici 2014) although the role of dendritic processes cannot be currently dismissed in some locations (Eisele and Duyckaerts 2016). The orientation of NF and GFAP positive fibers toward and within the amyloid core suggests the attraction of some axons and astrocytic processes by still unknown elements present in the core, maybe produced by microglia.

Several methods of microscopic dissection have been developed with goals that differ from those pursued by microcryodissection. Laser microdissection is performed to extract selected elements in the tissue to proceed to their biochemical analysis, e.g. mass spectrometry or PCR. Selective cellular immunoprecipitation requires the dissociation of the tissue to isolate its constituent cells. Microcryodissection does not extract microsamples or cells from the slide or from the sample but aims at tearing apart the elements of the tissue to facilitate their morphological analysis in situ (e.g. understand the way they are bound together or associated in specific structures such as the senile plaque). Microcryodissection improves the spatial resolution of the microscopic analysis in an unusual but simple way by directly acting on the sample.

Acknowledgements Electron microscopy was performed at the imaging platform of Pitié-Salpêtrière (PICPS) located at ICM. Alice Lebois helped to develop the freezing/thawing device. The samples were obtained from the Brain Bank Neuro-CEB (BRIF number 0033-00011), funded by the patients' associations France Parkinson, ARSEP, and “Connaître les Syndromes Cérébelleux” and by LECMA Vaincre Alzheimer, to which we express our gratitude. The

Brain Bank is hosted by the Biological Resource Platform of Pitié-Salpêtrière Hospital, APHP.

References

- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
- Braak H, Del Tredici K (2014) Are cases with tau pathology occurring in the absence of A β deposits part of the AD-related pathological process? *Acta Neuropathol* 128:767–772. doi:10.1007/s00401-014-1356-1
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier M-C (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118:5–36. doi:10.1007/s00401-009-0532-1
- Eisele YS, Duyckaerts C (2016) Propagation of A β pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol* 131:5–25. doi:10.1007/s00401-015-1516-y
- Frackowiak J, Wisniewski HM, Wegiel J et al (1992) Ultrastructure of the microglia that phagocytoses amyloid and the microglia that produces beta-amyloid fibrils. *Acta Neuropathol* 84:223–225
- Gonatas NK, Anderson W, Evangelista I (1967) The contribution of altered synapses in the senile plaque: an electron microscopic study in Alzheimer's dementia. *J Neuropathol Exp Neurol* 26:25–39
- Ludwig E, Klingler J (1956) *Atlas cerebri humani*. S. Karger, Basel
- Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ (1991) Comparative epitope analysis of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease senile plaque, neurites and neuropil threads. *Lab Invest* 64:352–357
- Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A β deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791–1800
- Weibel ER (1979) *Stereological methods. Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, London



Human subiculo-fornico-mamillary system in Alzheimer's disease: Tau seeding by the pillar of the fornix

Manon Thierry^{1,2} · Susana Boluda^{1,2} · Benoît Delatour¹ · Serge Marty¹ · Danielle Seilhean² · Brainbank Neuro-CEB Neuropathology Network · Marie-Claude Potier¹ · Charles Duyckaerts^{1,2} 

Received: 30 September 2019 / Revised: 29 November 2019 / Accepted: 30 November 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

In Alzheimer's disease (AD), Tau and A β aggregates involve sequentially connected regions, sometimes distantly separated. These alterations were studied in the pillar of the fornix (PoF), an axonal tract, to analyse the role of axons in their propagation. The PoF axons mainly originate from the subicular neurons and project to the mamillary body. Forty-seven post-mortem cases at various Braak stages (Tau) and Thal phases (A β) were analysed by immunohistochemistry. The distribution of the lesions showed that the subiculum was affected before the mamillary body, but neither Tau aggregation nor A β deposition was consistently first. The subiculum and the mamillary body contained Gallyas positive neurofibrillary tangles, immunolabelled by AT8, TG3, PHF1, Alz50 and C3 Tau antibodies. In the PoF, only thin and fragmented threads were observed, exclusively in the cases with neurofibrillary tangles in the subiculum. The threads were made of Gallyas negative, AT8 and TG3 positive Tau. They were intra-axonal and devoid of paired helical filaments at electron microscopy. We tested PoF homogenates containing Tau AT8 positive axons in a Tau P301S biosensor HEK cell line and found a seeding activity. There was no A β immunoreactivity detected in the PoF. We could follow microcryodissected AT8 positive axons entering the mamillary body; contacts between Tau positive endings and A β positive diffuse or focal deposits were observed in CLARITY-cleared mamillary body. In conclusion, we show that non-fibrillary, hyperphosphorylated Tau is transported by the axons of the PoF from the subiculum to the mamillary body and has a seeding activity. Either Tau aggregation or A β accumulation may occur first in this system: this inconstant order is incompatible with a cause-and-effects relationship. However, both pathologies were correlated and intimately associated, indicating an interaction of the two processes, once initiated.

Keywords Alzheimer's disease · Tau · Abeta · Subiculo-fornico-mamillary system · Seeding · Propagation · Biosensor · Microcryodissection · CLARITY · Electron microscopy · Axon propagation

The members of Brainbank Neuro-CEB Neuropathology Network are listed in the Acknowledgements section.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00401-019-02108-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Charles Duyckaerts
charles.duyckaerts@aphp.fr

¹ Alzheimer's and Prion Diseases Team, Paris Brain Institute, CNRS, UMR 7225, INSERM 1127, Sorbonne University UM75, Paris, France

² Laboratoire de Neuropathologie Raymond Escourolle, Pitié-Salpêtrière Hospital, APHP, Sorbonne University, 47, Blvd de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterised by extracellular accumulation of β -amyloid peptides (A β) and intracellular aggregation of hyperphosphorylated Tau proteins (hp-Tau). A β peptides accumulate in different types of extracellular deposits (diffuse, focal, neuritic, stellate and subpial [13]), while hp-Tau aggregates in the neuronal soma, leading to the formation of neurofibrillary tangles (NFTs) [7, 30]. Accumulation of hp-Tau in neurites leads to the formation of neuropil threads, thought to be mainly dendritic [5], while the hp-Tau positive neurites of the corona of the senile plaques are thought to be mainly axonal [53]. Thal phases (from 0 to 5) evaluate the progression of A β deposits [59] and Braak neurofibrillary stages (from 0 to VI), of hp-Tau accumulation [2].

Misfolded Tau proteins injected in Tau transgenic mice, which are too young to develop lesions induce early development of Tau aggregates that apparently propagate like a prion, following neural circuits [10]. A β pathology is also able to propagate in a prion-like way [47]—hence the term propagon that has been suggested for these protein assemblies [20]. The mechanism and kinetics of the initiation and propagation of Tau and A β lesions are still poorly understood, both in experimental animals and in humans. The amyloid cascade hypothesis [33, 54] posits that A β peptide aggregation is an early pathological process driving Tau phosphorylation, neurofibrillary tangle formation, synaptic loss and neuronal death.

We studied the subiculo-fornico-mamillary system in the human brain, to analyse the progression of Tau and A β pathologies, their timing and their relationship. The fornix, localised below the corpus callosum, is laterally limited on each side by the pillar of the fornix (PoF), a large intra-hemispheric associative bundle, 4.5 cm long and 0.75 cm in diameter. That bundle, a key element of the Papez circuit, links the hippocampal formation (including the subiculum) with the mamillary body, the septal and the accumbens nuclei [62] (Fig. 1a). The PoF is exclusively made of axons that can thus be studied in isolation, while they are difficult to identify in the neuropil, where they are mixed with dendrites. The PoF degenerates during AD [11]. The abundance of fibres of hippocampal origin in the PoF is illustrated by fornico-mamillary atrophy, in which neuronal loss in the hippocampus causes atrophy of the PoF and of the mamillary body (Fig. 1b). The majority of the axons travelling in the PoF originate from the neurons of the subiculum, where NFTs form as early as Braak stage III and amyloid

deposits are seen at Thal phase 2. Those axons project to the mamillary body, where NFTs appear from Braak stage IV and A β peptides accumulate at Thal phase 3 [2, 59]. The hippocampo-fornico-mamillary system is vascularised by different arteries: the posterior cerebral artery for the subiculum, the anterior communicating artery for the mamillary body [34]; diffusion through the vascular system is thus implausible. As both structures are wide apart, passive diffusion from one to the other is also unlikely. This system is thus well suited to investigate the propagation of Tau and A β lesions through defined axonal connections.

Materials and methods

Cases

Forty-seven post-mortem brains were investigated. All the brains had been removed and collected at Pitié-Salpêtrière hospital (Paris). They were stored in 4% formalin. In all the cases, the diagnostic procedure included A β (6F3D, Dako), Tau (AT8, Thermo-Fisher), α -synuclein (5G4, Sigma-Aldrich) and TDP-43 (Proteintech Group) immunohistochemistry. The hippocampus, the PoF and the mamillary body were analysed for each case. Among the 47 cases that we studied, 38 brains had been collected in a brain donation project and stored in the French national brain biobank Neuro-CEB (Bioresource Research Impact Factor number = BRIF BB-0033-00011). The cohort was composed of 15 women and 32 men, aged 51–96 (Table 1). The cases included 28 patients with no or asymptomatic AD lesions, deceased of other causes (Braak 0–IV) and 19 patients with

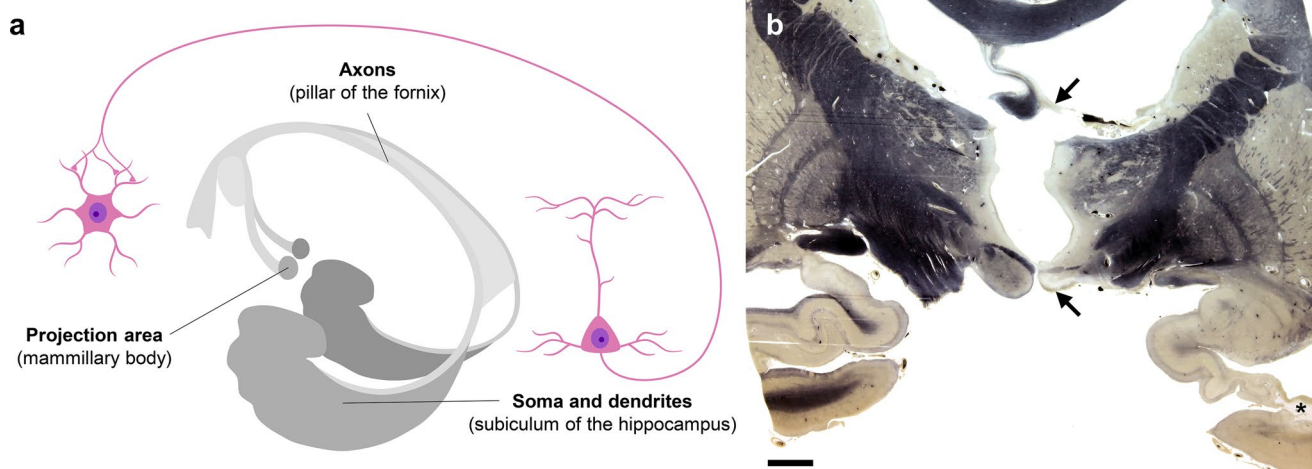


Fig. 1 The subiculo-fornico-mamillary system. **a** Anatomy of the subiculo-fornico-mamillary circuit. **b** Unilateral atrophy of the pillar of the fornix (upper arrow) and of the ipsilateral mamillary body (lower arrow) caused by an infarct of the subiculum (asterisk) in the

right hippocampus, demonstrating the importance of the subiculo-mamillary connections through the pillar of the fornix. Illustrative case from Escourolle Neuropathology Collection. Brain coronal section. Loyez myelin stain. Scale bar 5 mm

Table 1 Cases

Case	Braak (Tau)	Thal	Braak (α -synuclein)	Age	Gender	Diagnosis
Neuropathological analysis ($n=47$)						
01	0	0	0	51	M	Coronary atheroma and fungal pneumopathy
02	0	1	0	66	M	Acute myeloblastic leukaemia
03	I	0	0	65	M	Brain donation. Some ischemic neurons
04	I	1	0	74	F	Ischemic lesions
05	II	3	0	83	M	Large T-cell lymphoma
06	II	0	0	62	M	Ischemic cardiopathy, infarcts in contralateral hemisphere
07	II	1	0	81	M	Brain donation. Control
08	II	1	5	67	M	Parkinson's disease. Cortical Lewy bodies
09	III	2	0	85	M	Perirenal angiosarcoma with pulmonary metastases
10	III	4	0	73	F	Peritonitis and acute bronchopneumopathy
11	III	0	0	75	M	Cardio-respiratory arrest after parotidectomy. Some dilations of the perivascular space in the basal ganglia
12	III	4	5	84	M	Diffuse Lewy-body disease. High probability ^a
13	III	0	0	71	M	Peritonitis
14	III	0	0	54	F	Cirrhosis, and pulmonary infarction
15	III	0	0	92	F	Brain donation. Control
16	III	0	5	60	F	Parkinson's disease. Cortical Lewy bodies
17	III	3	6	84	M	Diffuse Lewy-body disease. High probability ^a
18	III	0	0	66	M	Cirrhosis
19	III	0	0	70	F	Brain donation. Minimal neuropathological changes. Type 2 CAA (meninges)
20	III	0	0	53	M	Sudden death
21	IV	2	0	86	M	Brain donation. Myocardial infarct. Type 1 CAA
22	IV	3	0	85	F	Lacune of the pons. Sclerohyalinosis
23	IV	3	0	71	M	Acute pancreatitis and cirrhosis
24	IV	4	0	74	M	Metastatic adenocarcinoma
25	IV	1	6	85	M	Parkinson's disease. Cortical Lewy bodies
26	IV	3	6	81	M	Parkinson's disease. Cortical Lewy bodies, argyrophilic grain disease, lacune of the pallidum, old occipital infarct
27	IV	3	6	84	M	Diffuse Lewy-body disease, High probability ^a . CAA (type 2)
28	IV	0	0	90	F	Non-demented individual with tau AD-related lesions
29	V	4	0	76	M	AD
30	V	5	6	81	M	AD, diffuse Lewy-body disease. Low probability ^a
31	V	4	6	76	F	AD, diffuse Lewy-body disease. Intermediate probability ^a
32	V	5	0	92	M	AD, Ammon's horn sclerosis and TDP-43 inclusions
33	V	4	6	87	M	AD, diffuse Lewy-body disease. Intermediate probability ^a
34	V	4	0	81	F	AD
35	V	4	Amygdala only	96	F	AD, amygdala Lewy bodies
36	V	5	6	80	M	AD, diffuse Lewy-body disease. Intermediate probability ^a
37	V	5	6	74	F	AD, diffuse Lewy-body disease. Intermediate probability ^a
38	VI	5	0	78	F	AD
39	VI	3	0	86	M	AD
40	VI	2	0	79	M	AD
41	VI	5	Amygdala only	73	F	AD, amygdala Lewy bodies
42	VI	5	0	68	F	Posterior cortical atrophy. AD
43	VI	5	0	79	M	AD
44	VI	5	0	60	M	AD
45	VI	5	0	66	M	AD
46	VI	4	0	79	M	AD
47	VI	3	0	65	M	AD

Table 1 (continued)

Case	Braak (Tau)	Thal	Braak (α -synuclein)	Age	Gender	Diagnosis	Technique(s)
Additional analyses ($n=6$)							
48	0	0	0	62	F	Multi-organ dysfunction syndrome	Electron microscopy
49	0	0	0	39	M	Brainstem glioma (samples were taken from uninvolved pillars of the fornix)	Cell culture
50	IV	5	0	91	M	AD	Cell culture, electron microscopy
51	VI	5	Amygdala only	61	F	AD, amygdala Lewy bodies	Microcryodissection
52	VI	5	0	81	F	AD	Clarity, electron microscopy
53	VI	5	0	76	M	AD	Cell culture

The cases are sorted according to Braak neurofibrillary stages [2]. “Braak (Tau)” stands for Braak and Braak neurofibrillary stages [2]; “Thal” refers to Thal et al. phases [59] and “Braak (α -synuclein)” indicates Braak et al. staging of synucleinopathy, related to sporadic Parkinson’s disease [6]. The hippocampus and the pillar of the fornix were sampled in all 47 cases. The hippocampus was studied in slices cut perpendicularly to its long axis. The fornix was cut parallel to its main axis. The mamillary body was studied in 41 cases (in 6 cases, the mamillary body was not available or too altered to be analysed). Six additional cases were sampled for microcryodissection and CLARITY techniques (two formalin-fixed mamillary bodies), electron microscopy analysis (three formalin-fixed transversal sections of hippocampus and three formalin-fixed longitudinal sections of the pillar of the fornix) and cell culture (three frozen pillars of the fornix)

AD Alzheimer’s disease, CAA cerebral amyloid angiopathy, PD Parkinson’s disease

^aThe probability refers to the “assessment of the likelihood that the pathologic findings are associated with a typical, dementia with Lewy bodies, clinical syndrome”, from McKeith et al. [46]

established AD (Braak V–VI). Among the 28 asymptomatic patients, 17 had mild Tau alterations associated with no or only little A β accumulation (Thal phase 1 or 2). It is common to observe cases with Tau pathology in the entorhinal area and hippocampus and no A β accumulation in the brain ([3], see also the prevalence curves obtained from the data of [3] in the companion paper [15]). Those cases have been recently isolated under the name of PART [12], a questionable construct [18]. Fourteen cases had Lewy bodies. Cases diagnosed with primary tauopathies were excluded from the study (i.e. progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, *MAPT* mutation, argyrophilic grain disease, Pick’s disease). The eight cases at Braak 0/I/II corresponded to control brains with no lesion in the hippocampus. Some Tau pathology was present in the subiculum in the 20 cases at Braak III/IV. The 19 cases at Braak V/VI had extensive Tau pathology in the subiculum, but also in the neocortex. Thal phases ranged from 0 to 5 (Table 1). Six additional cases (also listed in Table 1) were used for CLARITY, microcryodissection, electron microscopy analysis and cell culture seeding assays. The project was submitted to the “committee for the protection of persons” (ethical committee) Ile de France VI which did not object the study (April 20th 2016 session).

Histology analysis

The hippocampus, PoF and mamillary body were sampled after a fixation of at least 2 months in a 10% formalin solution (containing 4% formaldehyde). The samples were embedded in paraffin. The PoF was dissected and embedded

parallel to its long axis over a distance of at least 1 cm. The blocks were cut at a thickness of 3 μ m.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed with the Nexes station automated system (Ventana Medical System Inc., Roche). Deparaffinised and rehydrated sections were pre-treated and blocked, then incubated with the primary antibodies listed in Supplementary Table 1, online resource. The AT8, TG3, PHF1, Alz50, C3 and anti-myelin basic proteins (MBP) primary antibodies were detected with the *ultraView* Universal DAB Detection kit (Ventana Medical System Inc., Roche) or *OptiView* DAB immunohistochemistry Detection kit (Ventana Medical System Inc., Roche), according to the automated procedure summarised in supplementary Table 1, online resource. The kits include secondary antibodies (goat anti-mouse IgG, anti-mouse IgM and anti-rabbit) conjugated with horseradish peroxidase (HRP). The addition of H₂O₂ and diaminobenzidine leads to the formation of a brown precipitate in presence of HRP. The anti-A β 6F3D immunohistochemistry was performed manually following formic acid pretreatment (98% formic acid for 5 min); the primary antibody was incubated overnight. The MBP/Neurofilament and A β /Tau double immunostaining made use of the same protocol as previously described for the first primary antibody (anti-MBP and anti-A β 6F3D, respectively). The second primary antibody (anti-Neurofilament and AT8 anti-Tau, respectively) was revealed with the *ultraView* Universal Alkaline Phosphatase Red Detection kit (Ventana Medical System Inc., Roche), according to the automated procedure summarised in supplementary Table 1, online resource. The

detection kit includes secondary antibodies (goat anti-mouse IgG, anti-mouse IgM and anti-rabbit) conjugated with alkaline phosphatase (AP) and reagents (naphtol and fast red), leading to the formation of a red precipitate in presence of AP. The slides were counterstained with Harris haematoxylin and dehydrated. Coverslips were mounted in Pertex (Histolab, Labelians).

Gallyas silver impregnation

Gallyas method [27] was applied with the modifications proposed by Uchihara et al. [61] that result in the bleaching of the undesired myelin staining. The slides were counterstained with 0.1% nuclear fast red and dehydrated. Coverslips were mounted in Pertex (Histolab, Labelians).

Quantifications

An area covering the whole thickness of the subiculum was systematically observed with a 20× objective after AT8, TG3, Alz50, PHF1, and C3 anti-Tau immunohistochemistry and Gallyas staining. One hundred neuronal profiles and ghost tangles were examined. The proportion of neuronal profiles (total number of neurons as denominator) with pre-tangles, NFTs and ghost NFTs was assessed. A pilot study [31] had determined that the error coefficient improved only slowly when the number of assessed profiles was above 100. The percentages of positive profiles were converted into grades from 0 to 3 (0: 1% or less; 1: from 2 to 34%; 2: from 35 to 67%; 3: 68% or more). The volume density of A β deposits in the subiculum was estimated by point counting after anti-A β 6F3D immunohistochemistry [66]. A video camera transmitted the picture of the subiculum to a screen on which a grid of points was superimposed. The points were regularly spaced at 80 μ m intervals (9 rows \times 12 columns). The proportion of points falling onto A β immunoreactive material over a total of 100 points (\pm 10, depending on the size of the subiculum) was counted to estimate the areal density A_A [number of points falling onto A β immunoreactive material]/[total number of points]. A_A is an unbiased estimator of the volume ratio V_V [volume of A β deposits]/[total volume], according to Delesse principle ($A_A = V_V$) [66]. As A β was heterogeneously distributed, we chose to evaluate the areas in which the density appeared to be the highest: the assessment thus concerned the highest (rather than the mean) proportion of volume. The numerical densities of AT8, TG3, Alz50, PHF1, C3 and Gallyas positive axons were semi-quantitatively assessed on longitudinal sections of the PoF after adequate immunohistochemistry or staining. The following scale was applied: 0: no staining (1% of the labelled axons or less); 1: rare and patchy staining (from 2 to 34%); 2: staining with intermediate density (from 35 to 67%); 3: staining with high density (68% or more). In

the mamillary body, the density of AT8, TG3, Alz50, PHF1, C3 and Gallyas positive pre-tangles, NFTs and ghost NFTs was semi-quantitatively assessed as previously (from grade 0 to 3) as well as the volume proportion of A β deposits.

Density maps of the lesions in the mamillary body

Voronoi (or “Dirichlet”) tessellation was used to draw quantitative maps of the numerical density of the lesions in the mamillary body [16]. The maps were drawn with an apparatus made of a video system, of linear transducers fastened to the moving stage of the microscope, and of a computer with a mouse. The microscopic picture was visible on the computer screen. The mouse allowed drawing the contour of the studied region and pointing the Tau AT8 positive NFT or pre-tangles and the A β 6F3D positive deposits. The borders of the medial and lateral nuclei of the mamillary body were manually drawn on the video screen with the mouse. The transducers associated the points that had been drawn with X and Y coordinates [29] and guaranteed that they followed the movement of the microscope stage. Maps of A β deposits and AT8 Tau positive neuronal profiles were obtained. Coordinates of the borders of the medial and lateral nuclei of the mamillary body, and of the pointed lesions were stored in a file at the end of the acquisition step. These coordinates were used to analyse the data with a specially devised tessellation program. The region was divided into polygons limited by sides located at mid-distance of two neighbouring lesions and perpendicular to the line that joined them. Each polygon contained only one labelled lesion (A β deposit or neurofibrillary tangle or pretangle). The polygons covered the entire area of the region without overlaps or interstices, i.e. “tessellated” the plane. The area of each individual polygon is inversely proportional to the numerical density of the pointed lesions that it contains. When the density is high, the lesions are close to each other and the polygons are small. Assigning a colour to a range of polygon areas allowed drawing a ‘heatmap’ of the numerical density of the lesions [14, 16].

In vitro seeding experiments

Preparation of PoF homogenates

Approximately 100 mg of frozen PoF sampled from cases 49, 50 and 53, listed in Table 1, were thawed on ice. The tissue was mixed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific) to obtain a final solution of 10% weight/volume. Tissue was homogenised by 15–20 strokes in a 1 mL glass homogeniser (Fisher Scientific), briefly sonicated on ice with a Misonix Q125 sonicator (Q-sonica) and clarified by centrifugation (3000g, 5 min, 4 °C) as previously

described [10]. Supernatants were collected, aliquoted and stored at -80°C .

Preparation and treatment of biosensor cells sensitive to Tau seeding

Tau P301S biosensor HEK cells (#CRL-3275, ATCC, LGC Standards [38]) were grown in complete culture medium (DMEM with 10% FBS and 1% penicillin/streptavidin, Gibco, Thermo Fisher Scientific). They were treated with clarified PoF homogenates as in [26, 38] with minor modifications. Approximately 170,000 cells contained in 650 μL of complete medium were plated, per well, in a 24-well plate and left overnight in the incubator (37°C , 5% CO_2 and $\geq 80\%$ relative humidity). At around 60% of confluence, 100 μL of a transduction mix containing the PoF homogenate was added per well, in duplicate. The transduction mix was obtained by combining 43.75 μL Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) and 6.25 μL Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), with 12.5 μL of PoF homogenate added to 37.5 μL Opti-MEM. The transduction mix was briefly spun, then incubated for 1 h at room temperature, before being added to the cells. Treated cells were left in the incubator during 48 h. The experiment was replicated thrice.

Analysis

After treatment, cells were rinsed with PBS and re-plated on 13 mm diameter coverslips coated with poly-D-lysine (Sigma-Aldrich). The coverslips were left overnight in the incubator. They were rinsed with PBS and fixed for 10 min in 4% PFA. The cells were counterstained for 10 min with DAPI in 0.05% Triton X-100. The coverslips were mounted with Fluoromount (Sigma-Aldrich). Slides were stored in the dark at 4°C until observation with an inverted confocal Leica TCS SP8 DLS (Leica Microsystems). The CFP-positive cells were manually counted on the confocal images.

A β immunoassay

A β immunoassay of the clarified PoF homogenates, prepared as described above, was performed with the V-PLEX Plus A β Peptide Panel 1 (6E10) kit (Meso Scale Discovery), following the instructions of the manufacturer. A clarified frontal cortex homogenate derived from an AD brain (Braak VI, Thal 5) was used as positive control.

Electron microscopy

The aim was to observe, with electron microscopy, AT8 positive axonal threads present in the PoF. The subiculum and the PoF were sampled from two AD formalin-fixed

brains (cases 50 and 52). An additional PoF was sampled from a formalin-fixed brain devoid of any AD lesions and was used as control (case 48). The samples were sliced into 200 μm thick sections using a vibratome VT 1000S (Leica Microsystems). The PoF was cut along its longitudinal axis and the subiculum perpendicular to its long axis. No AT8 Tau labelling was observed with the immunogold method that appeared unsuitable for post-mortem formalin-fixed material. We thus used the direct visualisation of diaminobenzidine precipitates after AT8 Tau immunohistochemistry was performed without pretreatment and without detergent on the vibratome slices. Regions of interest (with an area of 1 mm^2) were dissected on the slices. The samples were washed in phosphate buffer and transferred into a 1% osmium solution for 1 h. After several washes in water, they were stained “en bloc” with a 5% uranyl acetate solution for 30 min. The samples were dehydrated in graded ethanol (from 50 to 100%) followed by acetone. They were incubated in 50% acetone—50% epon overnight, followed by pure epon for 2 h, before being cured at 60°C for 48 h in a dry oven. Semi-thin (0.5 μm) and ultrathin (70 nm) sections were cut using an EM UC7 (Leica Microsystems). Ultrathin sections were collected on copper grids and analysed with a Hitachi HT700 electron microscope (Hitachi, Milexia) operating at 100 kV. Pictures were taken with 2048 \times 2048 AMT R41-B CCD camera (AMT, Milexia).

Microcryodissection

One formalin-fixed mamillary body was sampled from an additional AD case (case 51). The sample was microcryodissected following the procedure previously described [60]. Briefly, cycles of freezing and thawing induce changes in the water volume contained in the sample, ice occupying more space than water. Repeated cycles separate the elements of the tissue. The sample was rinsed and left in water on a Peltier module. Three-hundred and twenty freezing and thawing cycles were achieved (program settings: 700 s ‘on’, freezing; 300 s ‘off’, thawing). Microcryodissected mamillary body was embedded in paraffin and analysed by immunohistochemistry as described above.

CLARITY

A 3 mm thick slice of a formalin-fixed mamillary body was taken from an AD case (< 1 year fixation; Braak VI, Thal 5; Case 52) and processed by the CLARITY technique adapted to post-mortem tissue [1]. The sample was embedded in an acrylamide hydrogel constituted of 4% acrylamide and 0.25% temperature-triggering initiator VA-044 in PBS. The sample was thoroughly washed in the clearing solution (200 mM boric acid, 4% SDS, pH 8.5) and placed in the X-CLARITY tissue clearing system (Logos Biosystems

Inc.). A direct current (1.5 A) and a constant flow of clearing solution heated to 40 °C were applied during a total of 96 h. The clearing solution was renewed every 24 h. After clearing, the sample was pretreated with formic acid 98% for 15 min. The tissue was blocked with 10% of goat and donkey sera (with a 1:1 ratio). The sample was incubated with a mouse monoclonal antibody anti-A β (4G8, BioLegend) and a rabbit polyclonal antibody anti-total-Tau (B19, gift from J.-P. Brion, Free University of Brussels, Belgium). Donkey anti-mouse Alexa 488 and goat anti-rabbit Alexa 555 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) were used as secondary antibodies. The sample was post-fixed in 4% paraformaldehyde and autofluorescence was quenched with 0.2 M glycine. The day before observation, the tissue was mounted with RapidClear[®]. The microscope analyses were made with an upright multiphoton Zeiss 710 NLO (Carl Zeiss Microscopy). The images were post analysed with Fiji (Fiji Is Just ImageJ, National Institutes of Health) and Imaris (Bitplane, Oxford Instruments).

Statistical analyses

All the data were analysed with GraphPad Prism 6, at a significance level of 5%. For discrete neuropathological data, non-parametric statistical tests were performed: Spearman test was used for analysis of correlation, Kruskal–Wallis and Friedman tests were used for one-way analysis of variance (respectively for untied or tied data) followed by Dunn's post hoc multiple comparisons when the null hypothesis was rejected. The means of groups with or without Lewy bodies were compared with Mann–Whitney. To illustrate the relationship between the data, we also drew a regression line with the hp-Tau semi-quantitative measures (Supplementary Figs. 2 and 3, online resource), with the hypothesis that the discrete data describing a severity gradient could be interpolated by the regression between the grades and that the grades had a binomial tending to a Gaussian distribution. In the seeding experiments, the number of CFP-positive HEK cells was expressed as a percentage of the total cell number counted. The mean percentages were compared using a Student *t* test, performed after an arcsine square root transformation (as recommended, [56] to approach a normal distribution).

Results

Distribution of Tau and A β accumulation in the subiculo-fornico-mamillary system

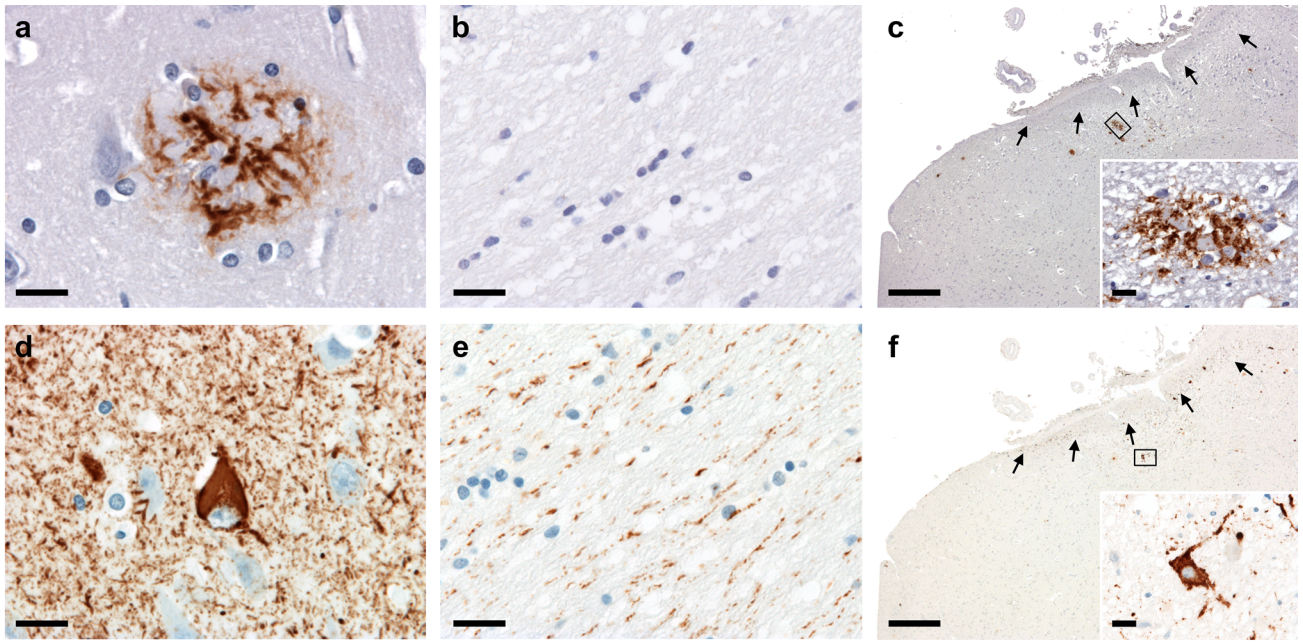
A β deposition in the subiculo-fornico-mamillary system

A β deposits were observed in the subiculum and in the mamillary body (Fig. 2a, c). No A β immunoreactivity was

detected in or around the axons of the PoF (Fig. 2b). This result was confirmed by A β 40 and A β 42 immunoassays in PoF homogenates from three cases at Braak stages 0 (negative control), IV and VI. In the PoF homogenates, A β 40 and A β 42 concentrations were below 2% and 8.5% of the positive control values, respectively. The volume proportions of A β deposits in the subiculum and in the mamillary body were positively correlated (Spearman test, $\rho_S = 0.720$, $p < 0.0001$). A β deposits were observed in the subiculum in 27 cases, in the absence of deposit in the mamillary body in two cases, while A β deposits in the mamillary body (25 cases) were systematically associated with A β deposits in the subiculum (Fig. 2g, i; supplementary Fig. 1, online resource). Lewy pathology did not modify A β accumulation (Mann–Whitney test, $p > 0.05$).

Hp-Tau accumulation in the subiculo-fornico-mamillary system

Pre-tangles, neurofibrillary and ghost tangles were observed in the subiculum and mamillary body (Fig. 2d, f). Only axonal threads, made of thin and fragmented AT8 positive axons, were found in the PoF (Fig. 2e). Three groups of cases (control, intermediate, severe) were then considered according to Braak neurofibrillary stages (Fig. 2j). In the eight control cases (Braak 0, I, II), no Tau AT8 immunoreactivity was, by definition, observed in the subiculum; Tau positive accumulation was also absent in the PoF and in the mamillary body. In the 20 intermediate cases (Braak III, IV), hp-Tau accumulations were detected in the subiculum and PoF, but were scarce in the mamillary body. In the 19 severe cases (Braak V, VI), they were abundant in the subiculum, PoF and to a lesser extent, in the mamillary body. Hp-Tau accumulation in the PoF was correlated both with hp-Tau accumulation in the subiculum, its area of origin (Spearman test, $\rho_S = 0.885$, $p < 0.0001$) and in the mamillary body, its target area (Spearman test, $\rho_S = 0.724$, $p < 0.0001$). The cases with hp-Tau accumulation in the subiculum, PoF, and mamillary body could be hierarchically ranked. Tangles in the subiculum were associated with axonal threads in the PoF in all but one case. Axonal threads in the PoF were systematically associated with tangles in the subiculum. Similarly, axonal threads in the PoF were observed in the absence of tangles in the mamillary body, while tangles in the mamillary body were always associated with axonal threads in the PoF (Fig. 2h; supplementary Fig. 2, online resource). Lewy pathology had no influence on the abundance and topography of hp-Tau accumulation (Mann–Whitney test, $p > 0.05$).



g

Cases	Sub-Aβ	PoF-Aβ	MB-Aβ
01	-	-	-
02	-	-	-
04	-	-	-
06	-	-	-
07	-	-	-
11	-	-	-
13	-	-	-
16	-	-	-
18	-	-	-
19	-	-	-
20	-	-	-
21	-	-	-
24	-	-	-
28	-	-	-
10	+	-	-
14	+	-	-
05	+	-	+
09	+	-	+
17	+	-	+
22	+	-	+
23	+	-	+
25	+	-	+
26	+	-	+
29	+	-	+
30	+	-	+
31	+	-	+
32	+	-	+
33	+	-	+
34	+	-	+
36	+	-	+
37	+	-	+
38	+	-	+
39	+	-	+
40	+	-	+
41	+	-	+
42	+	-	+
43	+	-	+
44	+	-	+
45	+	-	+
46	+	-	+
47	+	-	+
03	-	-	NA
08	-	-	NA
15	-	-	NA
12	+	-	NA
27	+	-	NA
35	+	-	NA

h

Cases	Sub-Tau	PoF-Tau	MB-Tau
01	-	-	-
02	-	-	-
04	-	-	-
05	-	-	-
06	-	-	-
07	-	-	-
24	+	-	-
09	+	+	-
11	+	+	-
13	+	+	-
14	+	+	-
16	+	+	-
19	+	+	-
20	+	+	-
21	+	+	-
23	+	+	-
29	+	+	-
37	+	+	-
10	+	+	+
17	+	+	+
18	+	+	+
22	+	+	+
25	+	+	+
26	+	+	+
28	+	+	+
30	+	+	+
31	+	+	+
32	+	+	+
33	+	+	+
34	+	+	+
36	+	+	+
38	+	+	+
39	+	+	+
40	+	+	+
41	+	+	+
42	+	+	+
43	+	+	+
44	+	+	+
45	+	+	+
46	+	+	+
47	+	+	+
03	-	-	NA
08	-	-	NA
12	+	+	NA
15	+	+	NA
27	+	+	NA
35	+	+	NA

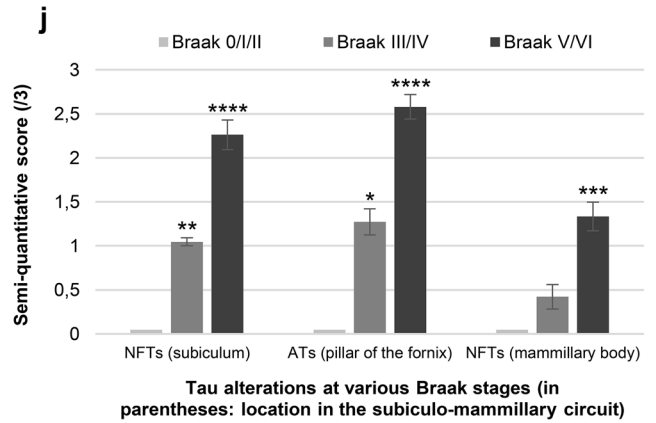
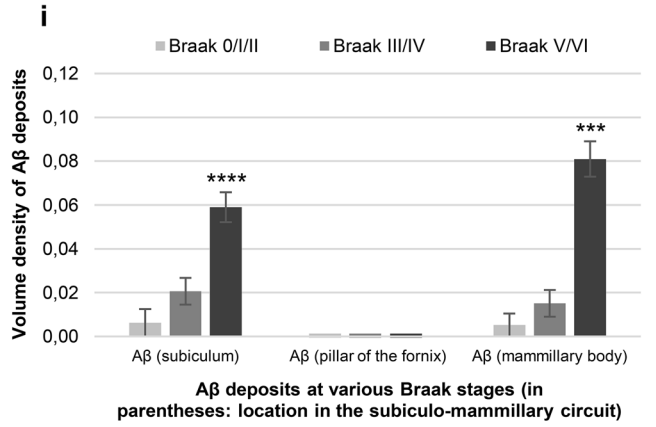


Fig. 2 Accumulation of hyperphosphorylated Tau and A β in the subiculo-fornico-mamillary system; A β deposits are found in the subiculum and mamillary body, but not in the pillar of the fornix. All the pictures have been taken from case 30. **a** A β deposits in the subiculum, anti-A β 6F3D immunohistochemistry (scale bar 20 μ m). **b** No accumulation of A β was detected in the pillar of the fornix after anti-A β 6F3D immunohistochemistry (scale bar 20 μ m). **c** A β deposits in the mamillary bodies, anti-A β 6F3D immunohistochemistry (scale bar 400 μ m). Insert: higher magnification of the rectangle showing the deposits (scale bar 20 μ m). **d** Tangles in the subiculum, anti-hp-Tau AT8 immunohistochemistry (scale bar 20 μ m). **e** Axonal threads made of thin and fragmented hp-Tau AT8 positive axons, in the pillar of the fornix (scale bar 20 μ m). **f** Tau pathology (pre-tangles, tangles and threads) in the mamillary body after AT8 anti-hp-Tau immunohistochemistry. Many axonal threads from the pillar of the fornix were seen at the periphery of the mamillary body, at the ending of the PoF (scale bar 400 μ m). Insert: higher magnification of the rectangle showing an AT8 positive neuron (scale bar 20 μ m). **g** Absence (-, light grey) or presence (+, dark grey) of A β deposits in the subiculum (Sub), pillar of the fornix (PoF) and mamillary body (MB). NA not available: six mamillary bodies could not be sampled; the six corresponding cases were excluded from the analysis of the hierarchical distribution (in grey, end of the table). **h** Absence (-, light grey) or presence (+, dark grey) of hp-Tau AT8 positive pre-NFTs, NFTs and ghost NFTs in the subiculum and mamillary body, and of hp-Tau AT8 positive threads in the pillar of the fornix. **i** Mean volume density of A β deposits as a function of Braak stages (Kruskal–Wallis and Dunn's post tests in comparison with the control group, which included cases at Braak stages 0/II/III, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). Error bars: Standard error of the mean. **j** Mean numerical density (semi-quantitative score) of hp-Tau AT8 positive changes as a function of Braak stage, in the subiculum, pillar of the fornix and mamillary body (Kruskal–Wallis and Dunn post-test in comparison with the control group which included cases at Braak stages 0/II/III: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). NFTs neurofibrillary tangles, ATs axonal threads. Error bars: standard error of the mean

Topography of A β deposits and hp-Tau accumulation in the mamillary body

A β was distributed peripherally, centrally or both peripherally and centrally in the mamillary body. The peripherally located deposits occupied a circular zone at the border of the medial nucleus of the mamillary body; they were stellate or irregular and diffuse. The central deposits were spherical, diffuse or focal (Fig. 3a, c, e). Most of the peripheral distributions were observed in the least affected cases (five cases at Braak < V and Thal < 4 for a total of six peripheral distributions). The central, or central and peripheral distributions were observed in the most advanced cases (14 cases among 19 with those distributions).

The topography of intraneuronal hp-Tau aggregation in the medial nucleus of the mamillary body started and predominated laterally close to the arrival of the PoF. The severity of the involvement of the lateral nucleus was in striking contrast with the relatively moderate changes observed in the medial nucleus (Fig. 3b, d, f). To illustrate the heterogeneity of distribution of A β accumulation and hp-Tau positive

pre-NFTs and NFTs, we drew density maps in six cases at various degrees of severity (Fig. 4).

Seeding properties of axonal Tau species in the PoF

The distribution of Tau pathology in the subiculo-fornico-mamillary system suggested an axonal progression of the pathology from the subiculum to the mamillary bodies through the PoF. To ascertain that possibility, we determined whether the AT8 positive accumulation observed in the PoF had seeding properties in Tau P301S biosensor HEK cells, co-expressing Tau P301S-CFP (cyan fluorescent protein) and Tau P301S-YFP (yellow fluorescent protein). PoF homogenates, containing AT8 positive axons (i.e. enriched in hp-Tau), indeed induced the development of numerous CFP positive inclusions of Tau P301S in the biosensor cells (Fig. 5b–d), contrarily to the homogenate obtained from a control PoF, devoid of any hp-Tau AT8 positive accumulations (Fig. 5a, d). CFP and YFP signals were colocalised.

Characterisation of PoF Tau molecular species, associated with a seeding activity

Phosphorylation and conformation features of Tau axonal threads in the PoF

To identify the molecular Tau species associated with the PoF seeding properties, TG3, PHF1, Alz50, C3 Tau immunohistochemistry and Gallyas silver impregnation were performed in a subset of 19 cases comprising four control cases (Braak 0, I, II), eight intermediate AD cases (Braak III, IV) and seven advanced AD cases at Braak VI (Fig. 6a–d). Tau axonal pathology observed in intermediate cases (Braak III, IV) was associated only with AT8, TG3 and to a lesser extent PHF1 positive axonal threads. A few Alz50 and C3 positive dots were additionally observed in the severe cases (respectively, six and five cases among seven severe cases). Only two severe cases had a few Gallyas positive threads (Fig. 7). Since the seeding activity was detected even in the case of intermediate severity, in which axons of the PoF were found to be only AT8, TG3, and PHF1 positive, we concluded that the seeding activity could still be present in the absence of misfolded, fibrillary or truncated Tau (Alz50, Gallyas and C3 negative).

Electron microscopy analysis of axonal Tau accumulations

Paired helical filaments (PHFs) were frequently observed in the subiculum at electron microscopy, but not within the axons of the PoF derived from the same AD case (Fig. 8a, b). Tau accumulation in the PoF was located in the axoplasm and did not involve the myelin sheath. DAB electron-dense precipitates did not permit identifying

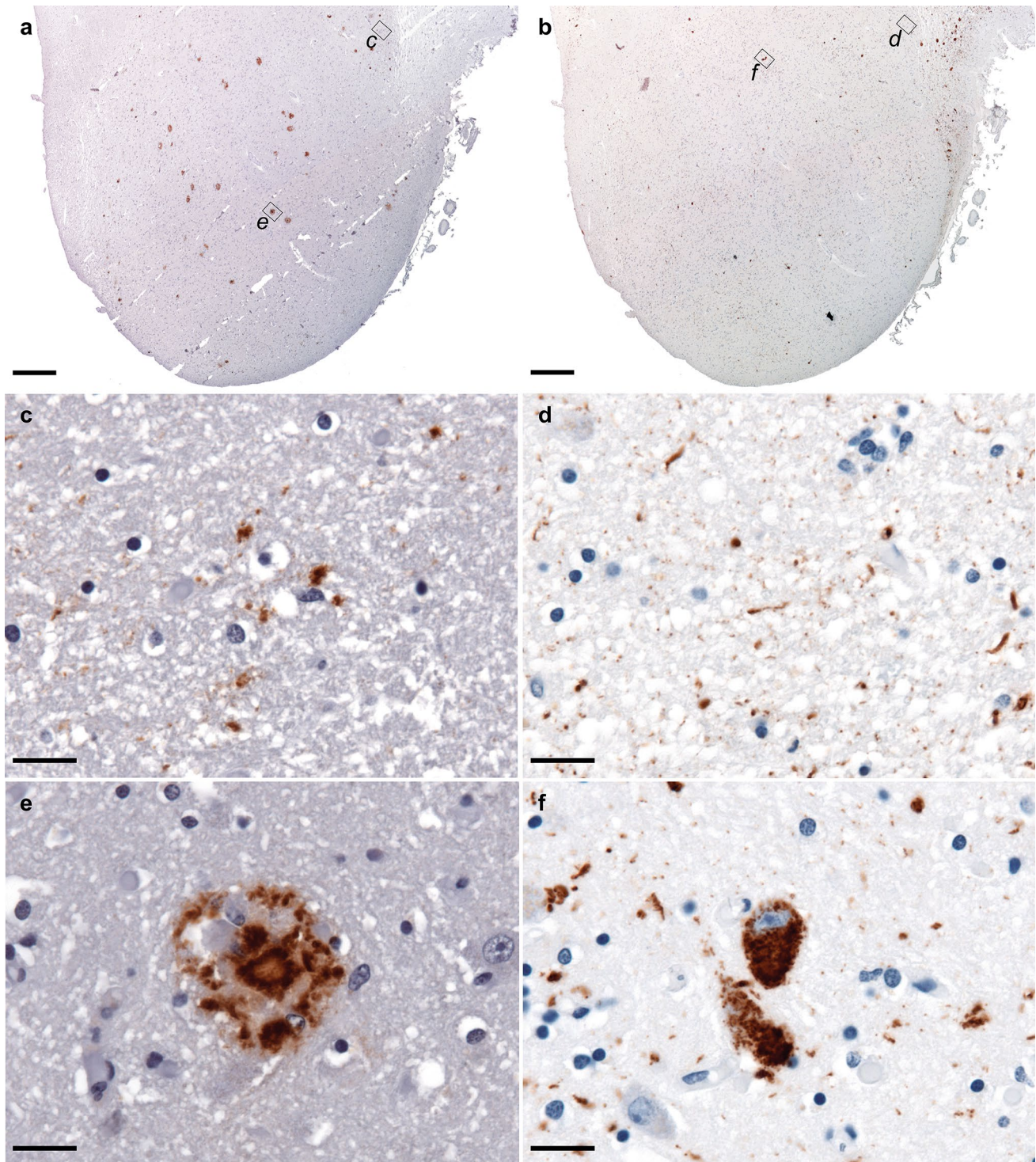


Fig. 3 A β extracellular deposits and hp-Tau intraneuronal accumulation in the mamillary body. **a** A β deposits in the mamillary bodies, anti-A β 6F3D immunohistochemistry (scale bar 400 μ m). **b** Tau pathology (pre-tangles, tangles and threads) in the mamillary body after AT8 anti-hp-Tau immunohistochemistry (scale bar 400 μ m).

Higher magnifications of the rectangles **c** and **e** showing a peripheral stellate deposit (**c**) and a central neuritic deposit (**e**). Scale bars 20 μ m. Higher magnifications of the rectangles **d** and **f** showing axonal threads at the periphery of the mamillary body, where the PoF ends (**d**) and neurofibrillary tangles (**f**). Scale bars 20 μ m

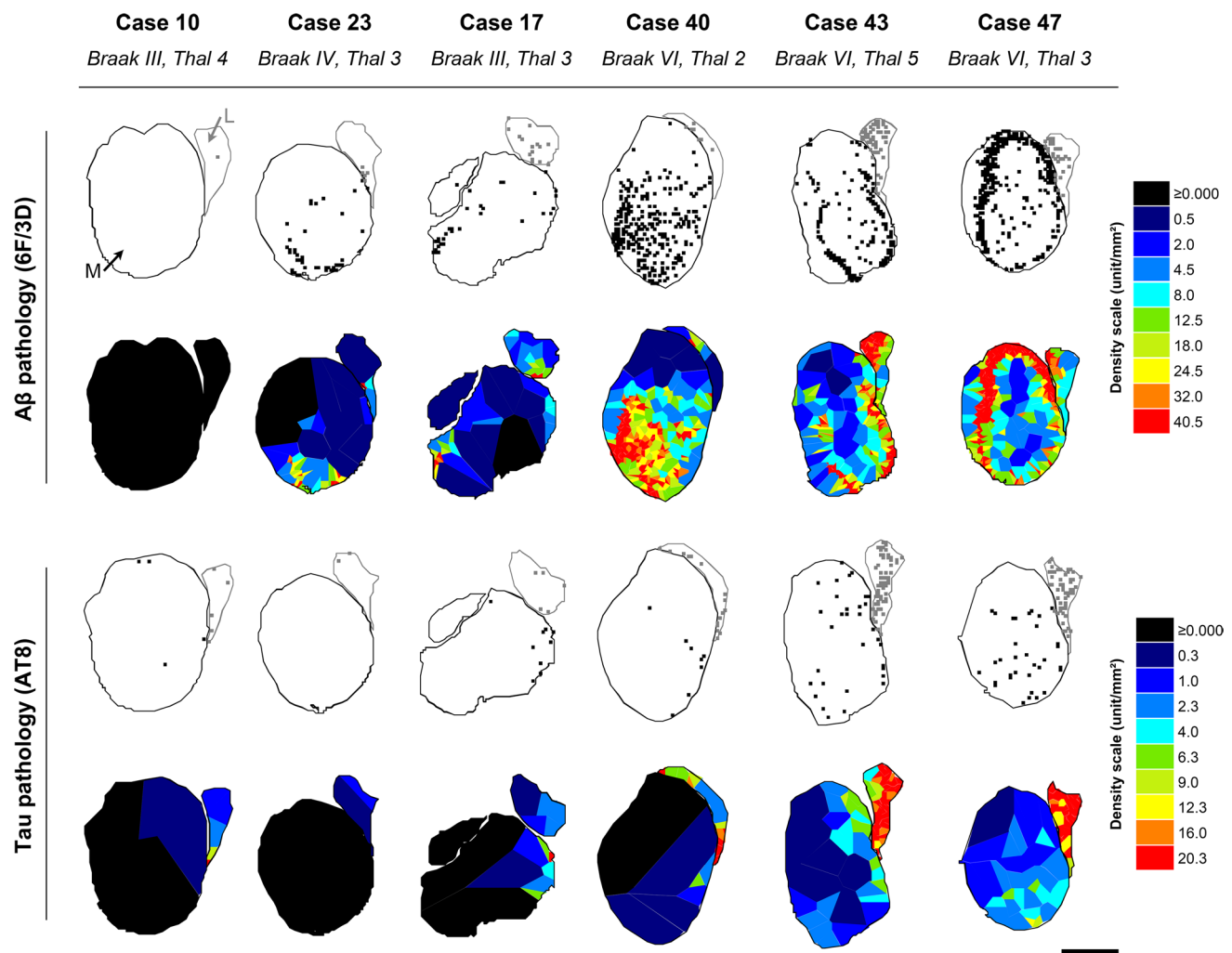


Fig. 4 Density maps of A β extracellular deposits and hp-Tau intraneuronal accumulation in the mamillary body. The maps were obtained from five post-mortem cases (listed in columns), corresponding to increased severities of A β and Tau pathologies in the mamillary body. Rows 1 and 3: maps in which the position of A β 6F3D positive extracellular deposits (row 1) or hp-Tau AT8 positive pre-NFTs, NFTs and ghost NFTs (row 3) is indicated by a dot. Black: medial nucleus (M) and grey: lateral nucleus (L) of the mamillary body. Rows 2 and 4: density maps obtained with a Voronoi (or “Dirichlet”) tessellation [16]. Polygons cover the mamillary body without interstices or overlap. Each polygon contains only one dot

(each dot corresponding to a plotted lesion) and is limited by borders located at mid-distance between the enclosed dot and its neighbours. Each point of the plane enclosed in a polygon is closer to the dot it contains than to any other dots of the map. The numerical density is inversely proportional to the polygon area (polygons are large when the lesions are wide part and small when they are close to each other) A β (row 2) or Tau (row 4) lesions. Colour scales: local density scales in unit/mm². Note that in case 40 the distribution of A β deposits was mainly central while it was peripheral and central in cases 43 and 47. The numerical density of the centrally located deposits was lower (in blue) than the density of peripherally distributed ones (red)

cytoskeleton structures or specific transport organelles in the PoF (Fig. 8b). We concluded that, as already shown by immunohistochemistry and histology, Tau accumulation in the PoF was generally made of non-fibrillary hp-Tau. Tau species found in the axons of the PoF despite the absence of fibrillary forms of the molecule or of PHF, had a seeding activity in the HEK biosensor cells.

Relationship between Tau and A β pathology

No constant hierarchical order between Tau and A β pathology

We had evidence of a propagation of hp-Tau pathology in the subiculo-fornico-mamillary system through axons. This evidence was lacking for A β . We wondered if we could find a hierarchical relationship of Tau and A β pathology among

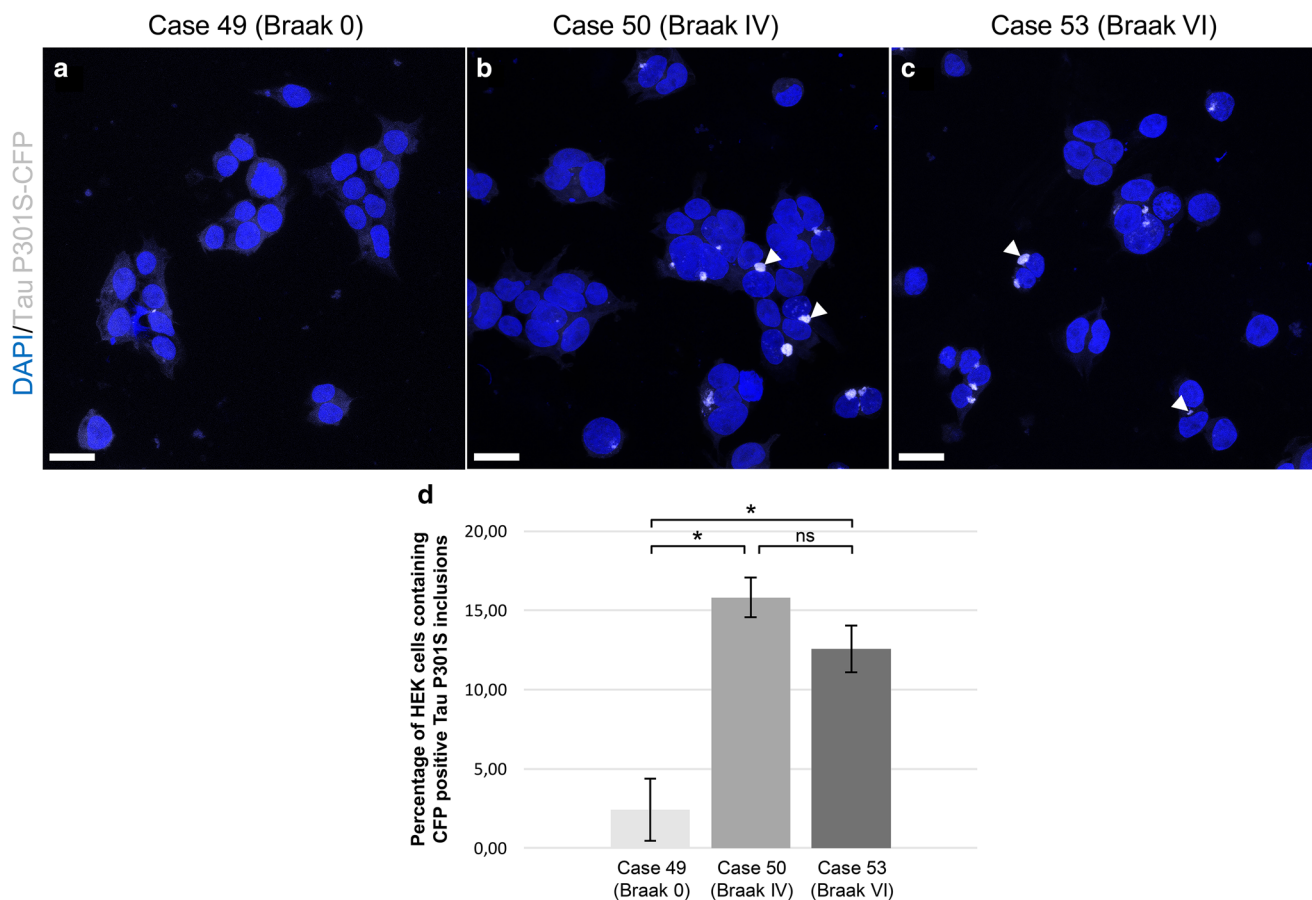


Fig. 5 Homogenates of the pillar of the fornix sampled from Alzheimer brains can act as seeds and induce Tau aggregation in vitro, in biosensor cells sensitive to Tau seeding. Homogenates of the pillar of the fornix (10% in PBS, 3000 g, 5 min) were obtained from frozen unfixed samples derived from a control case (**a**, case 49, Braak 0), a case of intermediate severity (**b**, case 50, Braak IV) and a severe Alzheimer case (**c**, case 53, Braak VI). HEK cells developed Tau P301S-CFP positive inclusions (arrowheads) when treated with homogenates from cases 50 and 53 containing Tau pathology, but not when treated

with the homogenate from the control case (case 49). Representative confocal images with maximal CFP and DAPI intensity projections from a stack of 59 sections (scale bar 20 μ m). **d** Mean percentage of HEK cells containing intracellular Tau P301S-CFP inclusions in each group, obtained after three repeated independent experiments (Student test, performed after arcsine square root transformation -applied to proportions in order to meet more closely a Gaussian distribution, *n.s.*: non-significant, **p* < 0.05). Error bars: standard error of the mean

the cases. We could not find, however, a constant hierarchical order linking directly axonal threads or NFTs on the one hand and A β deposits on the other (Fig. 9). Yet, cross-correlation analysis of the densities of Tau and A β pathologies in the subiculo-fornico-mamillary circuit showed that the strongest correlations involved the numerical density of NFTs in the subiculum (or axonal threads in the PoF) and the volume of A β deposition in the mamillary body (supplementary Fig. 3, online resource, for detailed statistical analysis):

- NFTs in the subiculum vs. A β deposits in the mamillary body (Spearman test, $\rho_S = 0.721$, $p < 0.0001$).
- Axonal threads in the PoF vs. A β deposits in the mamillary body (Spearman test, $\rho_S = 0.718$, $p < 0.0001$).

Ten of the 16 cases without A β deposit in the mamillary body had axonal threads in the PoF, while only one of the twenty-five cases with A β deposits in the mamillary body had no axonal threads in the PoF (case 05; Fig. 9). In that case, a few threads were seen in the mamillary body, in an area encompassing the border with the hypothalamus.

Anatomical relationships

Microcryodissection could dissociate in situ axons originating from the PoF and entering the mamillary body (Fig. 10a). Some of those dissociated axonal endings were filled with Tau AT8 positive material (Fig. 10b). Microcryodissected A β focal deposits were observed in contact with

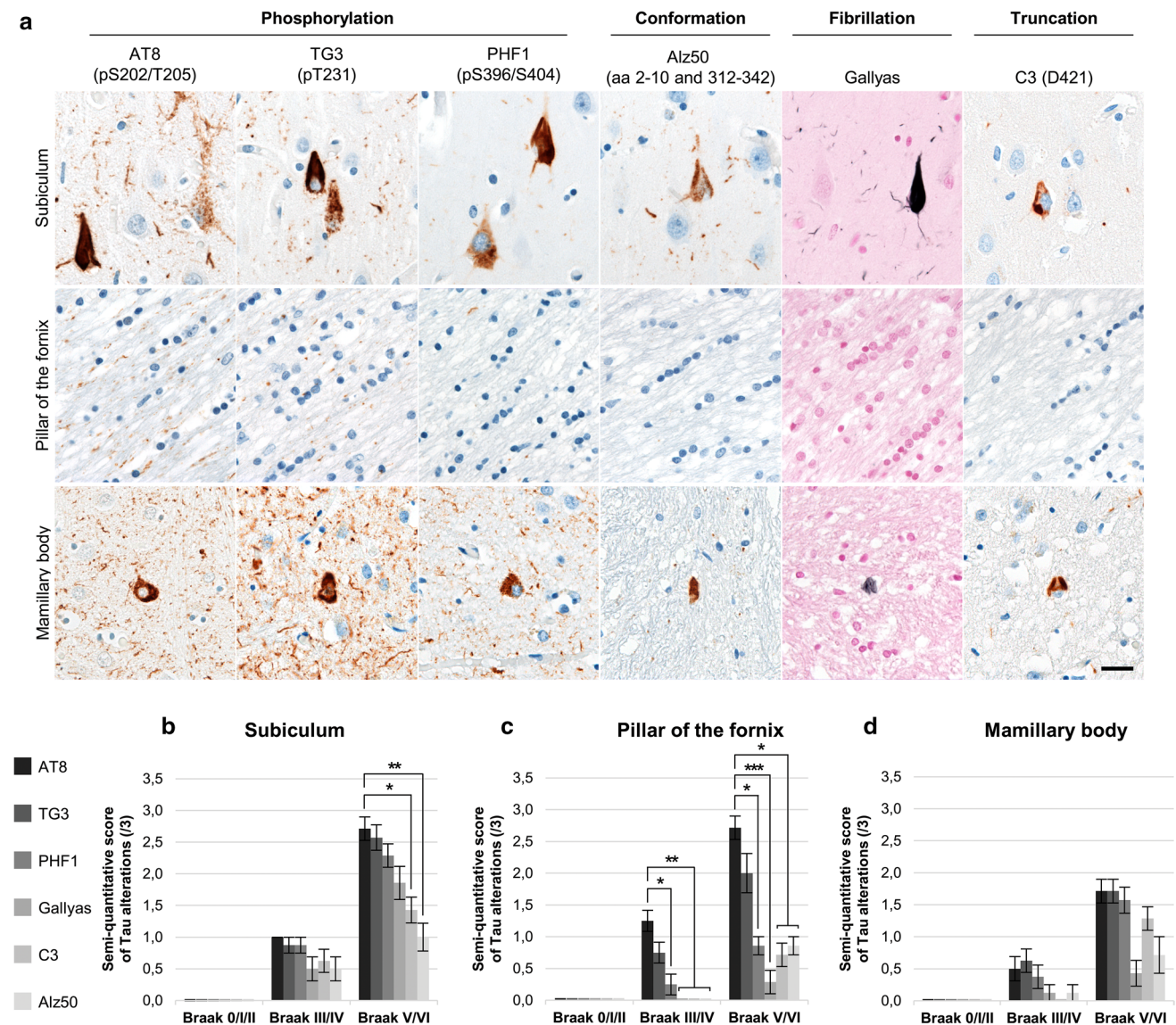


Fig. 6 Non-fibrillary hyperphosphorylated Tau is found in the axons of the pillar of the fornix. **a** Tau pathology observed in the subiculum, pillar of the fornix and mamillary body (in rows) after immunohistochemistry (IHC) against phosphorylation (AT8, TG3, PHF1), conformation (Alz50) or truncation (C3) dependent epitopes and Gallyas silver technique staining fibrillary Tau, shown in columns (scale bar: 20 μ m). Mean numerical density (semi-quantitative score) of Tau

alterations assessed in a subset of 19 cases at various Braak stages after AT8, TG3, PHF1, C3, Alz50 IHC or Gallyas silver stain in the subiculum (**b**), pillar of the fornix (**c**), mamillary body (**d**). Friedman and Dunn post-test in comparison with the values obtained after AT8 IHC, considered as the reference group (AT8): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Error bars: standard error of the mean

Tau AT8 positive axonal threads in the area of the mamillary body, where fibres diverge from the bundle of the PoF (Fig. 10c).

CLARITY gave a 3D view of the various types of A β deposits observed in the mamillary body. They were either diffuse (Video 1, online resource) or cored and sometimes neuritic (Video 2, online resource). Tau positive neurites were seen entangled into A β diffuse deposits, but repelled from the amyloid core. They were sometimes in contact with A β immunoreactive material. A β deposits were observed in

the lateral and peripheral parts of the mamillary body, in the PoF terminal fields (Video 3, online resource).

Discussion

We have shown that pathological Tau found in the axons of the PoF, in the human subiculo-fornico-mamillary system, has a seeding capacity—a result that supports previous observations in cell and animal models, in which Tau

Fig. 7 Labelling profile of Tau axonal pathology in the pillar of the fornix. A subset of 19 cases at various Braak stages is listed according to the absence (–, light grey) or presence (+, dark grey) of Tau pathology in the pillar of the fornix, detected with AT8, TG3, PHF1, Alz50, C3 immunocytochemistry and Gallyas silver impregnation. Alz50 and C3 immunostained mainly small dots. The presence of rare dot-like immunoreactive material is indicated by “+/-”. The control group refers to Braak stages 0, I or II, the intermediate group, to Braak stages III or IV, and the severe group to Braak stages V or VI

	Cases	AT8	TG3	PHF1	Alz50	C3	Gallyas
Control	01	-	-	-	-	-	-
	04	-	-	-	-	-	-
	06	-	-	-	-	-	-
	07	-	-	-	-	-	-
Intermediate	10	+	-	-	-	-	-
	18	+	-	-	-	-	-
	14	+	+	-	-	-	-
	21	+	+	-	-	-	-
	22	+	+	-	-	-	-
	23	+	+	-	-	-	-
	19	+	+	+	-	-	-
	28	+	+	+	-	-	-
Severe	40	+	+	+	-	-	-
	43	+	+	-	+/-	+/-	-
	47	+	+	+	+	-	-
	38	+	+	+	+	+	-
	46	+	+	+	+	+	-
	44	+	+	+/-	+/-	+/-	+
	45	+	+	+	+	+/-	+

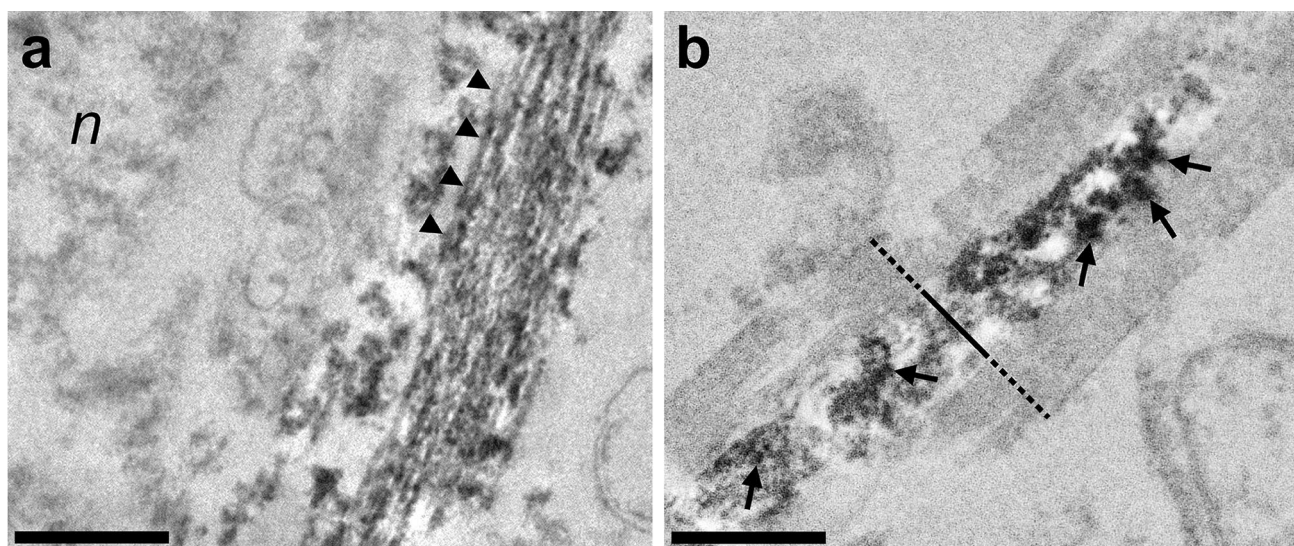


Fig. 8 Intra-axonal aggregates of hyperphosphorylated Tau, devoid of PHF, in the pillar of the fornix. Diaminobenzidine electron-dense precipitates observed at electron microscopy after AT8 anti-hp-Tau immunohistochemistry in the subiculum (a) or in the pillar of the fornix (b) of an Alzheimer case (Braak VI, Thal 5; scale bar 500 nm). a AT8 labelled PHFs located in the perikaryon of a neuron in the

subiculum (arrowheads). n nucleus. b hp-Tau AT8 positive staining (arrows) in an axon of the pillar of the fornix, devoid of any PHF. AT8 immunoreactivity was located in the axoplasm (solid line) and absent in the myelin sheath (dashed line). We could not identify cytoskeleton components or organelles associated with hp-Tau immunoreactivity

pathology is transmitted from cell to cell through neuronal connections [8, 10, 32, 40, 57, 58, 65]. The study of Tau pathology in the subiculum, in the PoF, one of its major efferent tracts and in the mamillary body, its main projection area, suggested that Tau pathology progressed in an anterograde direction. Tau aggregates in the cell body of the subicular neurons were immunolabelled by antibodies against hp-Tau (AT8, TG3 and PHF1), misfolded Tau

(Alz50) and N-truncated Tau (C3) and silver stained with Gallyas method, which is thought to stain only fibrillary Tau structures. The PHF nature of the aggregates was confirmed by electron microscopy. The PoF was cut longitudinally to facilitate the analysis of the fibre tract. The axons of the PoF, principally issued from the subicular neurons, were, by contrast, preferentially immunolabelled by AT8 and TG3 antibodies, less extensively by PHF1 antibody,

Fig. 9 No relationship could be observed between Tau and A β pathology distribution. Cases listed according to the absence (–, light grey) or presence (+, dark grey) of Tau or A β pathology in the subiculum (sub-Tau or sub-A β), pillar of the fornix (PoF–Tau or PoF–A β) and mamillary body (MB–Tau or MB–A β). NB: Six mamillary bodies could not be sampled; the six corresponding cases were excluded from the analysis of the hierarchical distribution (in grey, end of the table)

Cases	Sub-Tau	Sub-A β	PoF-Tau	PoF-A β	MB-Tau	MB-A β
01	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-
07	-	-	-	-	-	-
05	-	+	-	-	-	+
24	+	-	-	-	-	-
11	+	-	+	-	-	-
13	+	-	+	-	-	-
16	+	-	+	-	-	-
19	+	-	+	-	-	-
20	+	-	+	-	-	-
21	+	-	+	-	-	-
14	+	+	+	-	-	-
09	+	+	+	-	-	+
23	+	+	+	-	-	+
29	+	+	+	-	-	+
37	+	+	+	-	-	+
18	+	-	+	-	+	-
28	+	-	+	-	+	-
10	+	+	+	-	+	-
17	+	+	+	-	+	+
22	+	+	+	-	+	+
25	+	+	+	-	+	+
26	+	+	+	-	+	+
30	+	+	+	-	+	+
31	+	+	+	-	+	+
32	+	+	+	-	+	+
33	+	+	+	-	+	+
34	+	+	+	-	+	+
36	+	+	+	-	+	+
38	+	+	+	-	+	+
39	+	+	+	-	+	+
40	+	+	+	-	+	+
41	+	+	+	-	+	+
42	+	+	+	-	+	+
43	+	+	+	-	+	+
44	+	+	+	-	+	+
45	+	+	+	-	+	+
46	+	+	+	-	+	+
47	+	+	+	-	+	+
03	-	-	-	-	/	/
08	-	-	-	-	/	/
15	+	-	+	-	/	/
12	+	+	+	-	/	/
27	+	+	+	-	/	/
35	+	+	+	-	/	/

and were devoid of any PHF except in two severe cases. We were able to show that these non-fibrillary molecular species had a seeding activity on the Tau P301S HEK bio-sensor cells. The seeding activity was independent from N-truncated Tau (no C3 positive threads), aggregated Tau (no Gallyas positive threads) or PHF (no PHF at electron microscopy) and was associated with a high concentration of Tau phosphorylated at the specific sites Ser202/

Thr205 and Thr231, recognised by AT8 and TG3 antibodies. This suggested that the axons of the PoF, containing but a subset of the Tau species detected in the cell body of the subicular neurons, could transmit pathology to the neurons of the mamillary body that secondarily acquired the same, and complete, immunolabelling and staining profile as those of the subiculum. We could not find any

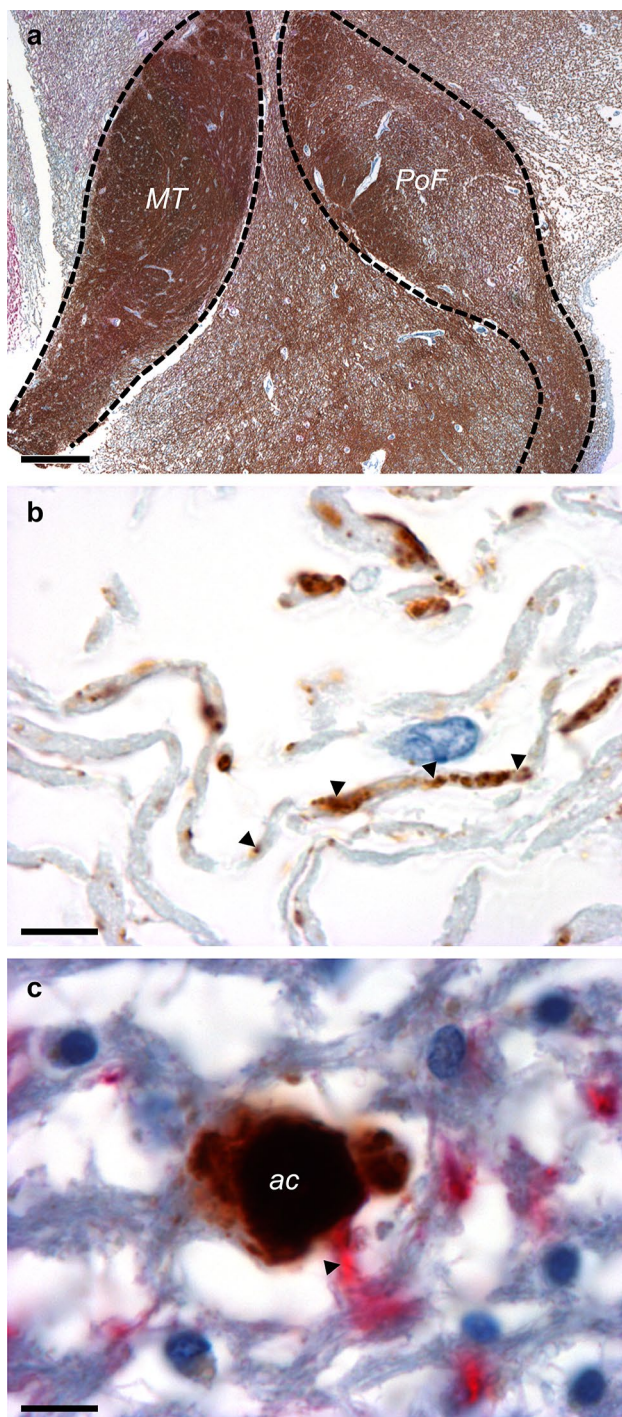


Fig. 10 Hyperphosphorylated-Tau positive axonal threads are in contact with A β deposits in the mamillary body. **a** Coronal section of the mamillary body after microcryodissection. Preserved aspect of the microcryodissected section at low magnification. Anti-MBP/NF immunohistochemistry (myelin basic protein—MBP—in brown, neurofilament—NF—in red). PoF: end of the afferent pillar of the fornix. MT: origin of the efferent mamillo-thalamic tract (scale bar 400 μ m). **b** Isolated axons of the pillar of the fornix filled with hp-Tau AT8 positive material (arrowheads), observed in the mamillary body after microcryodissection. Anti-hp-Tau AT8 immunohistochemistry (scale bar 8 μ m). **c** Microcryodissected A β focal deposit in contact with a hp-Tau AT8 positive axonal thread (arrowhead) in the mamillary body. Anti-A β 6F3D/hp-Tau AT8 immunohistochemistry (A β in brown, Tau in red, scale bar 8 μ m). *ac* amyloid core

influence of α -synuclein pathology on Tau aggregation and A β deposition in the subiculo-fornico-mamillary system.

The NFT seen in the subiculum preceded the appearance of threads in the PoF. The presence of AT8 positive threads in the PoF has already been described [49]. The authors also mentioned AT8 positive astrocytes in the mamillary body. We considered, as they did, that these were changes characteristic of aging-related tau astroglipathy (ARTAG). We completed the study of Plowey and Ziskin [49] by studying the PoF tangentially to its direction: this procedure allowed us to have a better view on the Tau positive threads. As mentioned, we also characterised the immunological profile of the threads and showed that they had a seeding activity despite the absence of PHF demonstrated by electron microscopy.

Tau hyperphosphorylation has been shown to strongly contribute to the seeding efficiency and propagation capacity of Tau [39]. Recent evidence, however, indicates that the conformation of Tau protein, independently of its phosphorylation state, is crucial [48]. The abnormal conformations of Tau in the PHF of AD [23, 25] and of chronic traumatic encephalopathy [24] and in Pick's bodies [22] have been described at the molecular level with cryo-EM, but PHF could be a final change that occurs late, while the seeding properties may be present early in the course of Tau alteration. It has been shown that misfolded monomers actually play an essential role in the seeding of Tau pathology [48, 55], but their conformation has not been elucidated. It could be similar or different from the conformation described in PHF. The sequence (VQIINK/VQIVYK) that is exposed in the seeding monomers and is thought to be important for their aggregation [48, 64], could be engaged in the fibrillation, after the initial seeding.

In all the cases with accumulation of A β in the mamillary body, A β had also accumulated in the subiculum, while two cases with A β accumulation in the subiculum had none in the mamillary body. This regional distribution is compatible with a transmission of A β pathology from the subiculum to the mamillary body (as already suggested by Thal et al. [59], see their Fig. 6). However, we could not find any histological or biochemical evidence of a transport of A β through the PoF. This negative result does not preclude the possibility of a transfer of soluble species such as oligomers. As far as we know, there is currently no biosensor yet available to detect A β aggregation seeding activity. It has been repeatedly emphasised that the progression of A β pathology through the brain was not only related to connections, but to other possible pathways such as diffusion through extracellular space or through basal membrane [20]: in the human, Tau pathology was absent from—and A β accumulated in—a disconnected piece of cortex in a patient with AD [17]; transmission of A β pathology may occur through contaminated dural graft

[37, 43], injection of contaminated cadaver-derived growth hormone or, possibly, neurosurgical procedures [9, 19, 41, 42, 51]. In transgenic mice, A β deposits may develop in the brain after intraperitoneal injection of A β -containing brain extracts [21]. Because the mamillary body is not contiguous with the subiculum, passive diffusion through the subiculo-mamillary system is less probable than axonal transport through the PoF.

We attempted to find a link between Tau aggregation and A β accumulation in the subiculo-fornico-mamillary system. Although there was indeed a strong correlation between the volume densities of A β deposits and the semi-quantitative score of Tau in the subiculum, fornix and mamillary body, we were unable to demonstrate a hierarchical order that would suggest a cause-and-effect relationship: in three cases, the presence of Tau NFTs in the mamillary body was not associated with A β deposits; in five cases in which A β deposits were seen, there was no Tau aggregates in the mamillary body. A cause-and-effect relationship between A β accumulation and Tau aggregates has been sought for decades [4, 45]: in the cascade hypothesis, A β accumulation causes Tau aggregates [33]. It should, however, be emphasised that Tau aggregation has never been observed in APP or APP \times PS1 transgenic mice even in animals expressing human Tau. In the opposite scenario, only tangle-bearing neurons are able to produce fibrillary A β [4], but aggregation of abnormal Tau, sharing the immunohistochemical properties of AD Tau, is not always associated with A β accumulation [3], see figure in [15]. A third scenario remains to be discussed: the relationship between A β deposition and Tau aggregation could be a promotion of the second by the first, rather than a link of cause-and-effect. A β deposition, indeed, promotes Tau aggregation and diffusion [35, 52, 63], possibly through an interaction with the prion protein [28], but, by contrast, Tau aggregation does not promote A β deposition [36, 44, 50]. In the subiculo-fornico-mamillary system, the distribution of the lesions strongly suggests that pathology is initiated by Tau aggregation in the subiculum. Tau aggregation appears to follow the anterograde direction, affecting first the PoF and reaching secondarily the mamillary body. It is correlated with A β accumulation, but this correlation is not a consequence of a cause-and-effect relationship: there is at least one case of A β accumulation that is not associated with Tau pathology and there are several cases of Tau aggregation without A β accumulation. In agreement with this absence of causality, experimental evidence suggests that the correlation is rather due to a promotion of Tau aggregation by A β : when A β accumulation, independently initiated, keeps progressing, it tends to promote Tau pathology. The simultaneous increase of Tau and A β pathology explains the positive correlation. The interaction between Tau aggregation and A β accumulation probably takes place in the senile

plaque: microcryodissection and CLARITY indeed show a physical interaction of both pathologies at that level.

Acknowledgements This project received financial support from France Alzheimer (project “Propagation of Tau and A β aggregation through axons in the subiculo-fornico-mamillary system: tracking propagons” and Ibis (Project “Neuro-CEB better”). Manon Thierry was funded by a doctoral scholarship from the Ministry of Research and Higher Education, attributed by the doctoral school “Physiology, Physiopathology and Therapeutics-ED394” (Sorbonne University). The human samples were obtained from the Neuro-CEB brain bank (BRIF Number 0033-00011), partly funded by the patients’ associations ARSEP, ARSLA, “Connaître les Syndromes Cérébelleux”, France-DFT, France Parkinson and by Vaincre Alzheimer Fondation, to which we express our gratitude. We are also grateful to the patients and their families. We thank Sabrina Leclère-Turbant and Marie-Claire Artaud for their technical and managerial assistance with post-mortem human samples. The brain bank is hosted by the Biological Resources Platform of Pitié-Salpêtrière Hospital, APHP. Brain clarification with CLARITY was performed on the ICM HISTOMICS platform. Cell culture experiments were performed on the ICM CELIS platform. Biphoton, confocal and electronic microscopy pictures were acquired on the ICM. QUANT imaging platform. We thank the technical team of the Raymond Escourrolle neuropathology department as well as the technical staff involved at ICM, including Valérie Thuries and Annick Prigent for their help and technical advices in histology, Julien Dumont for his assistance and expertise in CLARITY-cleared tissue imaging and analysis and Dominique Langui and Asha Baskaran for their help and knowledge in electron microscopy analysis. We also thank Jean-Pierre Brion and Kunie Ando for their valuable advices and discussion. The Neuro-CEB Neuropathology network includes: Dr. Franck Letournel (CHU Angers), Dr. Marie-Laure Martin-Négrier (CHU Bordeaux), Pr. Françoise Chapon (CHU Caen), Pr. Catherine Godfraind (CHU Clermont-Ferrand), Pr. Claude-Alain Maurage (CHU Lille), Dr. Vincent Deramecourt (CHU Lille), Dr. David Meyronnet (CHU Lyon), Dr. Nathalie Streichenberger (CHU Lyon), Dr. André Maues de Paula (CHU Marseille), Pr. Valérie Rigau (CHU Montpellier), Dr. Fanny Vandenbos-Burel (Nice), Pr. Charles Duyckaerts (CHU PS Paris), Pr. Danielle Seilhean (CHU PS, Paris), Dr. Susana Boluda (CHU PS, Paris), Dr. Isabelle Plu (CHU PS, Paris), Dr. Serge Milin (CHU Poitiers), Dr. Dan Christian Chiforeanu (CHU Rennes), Pr. Annie Laquerrière (CHU Rouen), Dr. Béatrice Lannes (CHU Strasbourg).

References

1. Ando K, Laborde Q, Lazar A, Godefroy D, Youssef I, Amar M et al (2014) Inside Alzheimer brain with CLARITY: senile plaques, neurofibrillary tangles and axons in 3-D. *Acta Neuropathol* 128:457–459. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1322-y>
2. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
3. Braak H, Braak E (1997) Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 18:351–357
4. Braak H, Del Tredici K (2013) Amyloid- β may be released from non-junctional varicosities of axons generated from abnormal tau-containing brainstem nuclei in sporadic Alzheimer’s disease: a hypothesis. *Acta Neuropathol* 126:303–306. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1153-2>
5. Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1986) Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer’s disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* 65:351–355

6. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197–211. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00065-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9)
7. Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Mise en évidence immunologique de la protéine Tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol (Bruxelles)* 95:229–235
8. Calafate S, Buist A, Miskiewicz K, Vijayan V, Daneels G, de Strooper B et al (2015) Synaptic contacts enhance cell-to-cell tau pathology propagation. *Cell Rep* 11:1176–1183. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>
9. Cali I, Cohen ML, Haik S, Parchi P, Giaccone G, Collins SJ et al (2018) Iatrogenic Creutzfeldt–Jakob disease with Amyloid- β pathology: an international study. *Acta Neuropathol Commun* 6:5. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0503-z>
10. Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A et al (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11:909–913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
11. Copenhagen BR, Rabin LA, Saykin AJ, Roth RM, Wishart HA, Flashman LA et al (2006) The fornix and mammillary bodies in older adults with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and cognitive complaints: a volumetric MRI study. *Psychiatry Res Neuroimaging* 147:93–103. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2006.01.015>
12. Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, Abisambra JF, Abner EL, Alafuzoff I et al (2014) Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* 128:755–766. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1349-0>
13. Delaère P, Duyckaerts C, He Y, Piette F, Hauw JJ (1991) Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol* 81:328–335. <https://doi.org/10.1007/bf00305876>
14. Duyckaerts C, Godefroy G (2000) Voronoi tessellation to study the numerical density and the spatial distribution of neurones. *J Chem Neuroanat* 20:83–92. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(00\)00064-8](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(00)00064-8)
15. Duyckaerts C, Hauw J-J (1997) Prevalence, incidence and duration of Braak's stages in the general population: can we know? *Neurobiol Aging* 18:362–369
16. Duyckaerts C, Godefroy G, Hauw JJ (1994) Evaluation of neuronal numerical density by Dirichlet tessellation. *J Neurosci Methods* 51:47–69. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90025-6)
17. Duyckaerts C, Uchihara T, Seilhean D, He Y, Hauw J-J (1997) Dissociation of Alzheimer type pathology in a disconnected piece of cortex. *Acta Neuropathol* 93:501–507
18. Duyckaerts C, Braak H, Brion J-P, Buée L, Del Tredici K, Goedert M et al (2015) PART is part of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 129:749–756. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1390-7>
19. Duyckaerts C, Sazdovitch V, Ando K, Seilhean D, Privat N, Yilmaz Z et al (2018) Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt–Jakob disease and immunoassay of French cadaver-sourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of A β pathology. *Acta Neuropathol* 135:201–212. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1791-x>
20. Eisele YS, Duyckaerts C (2016) Propagation of A β pathology: hypotheses, discoveries, and yet unresolved questions from experimental and human brain studies. *Acta Neuropathol* 131:5–25
21. Eisele YS, Obermuller U, Heilbronner G, Baumann F, Kaeser SA, Wolburg H et al (2010) Peripherally applied A β -containing inoculates induce cerebral β -amyloidosis. *Science* 330:980–982. <https://doi.org/10.1126/science.1194516>
22. Falcon B, Zhang W, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ, Vidal R et al (2018) Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold. *Nature* 561:137–140. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0454-y>
23. Falcon B, Zhang W, Schweighauser M, Murzin AG, Vidal R, Garringer HJ et al (2018) Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathol* 136:699–708. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1914-z>
24. Falcon B, Zivanov J, Zhang W, Murzin AG, Garringer HJ, Vidal R et al (2019) Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature* 568:420–423. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1026-5>
25. Fitzpatrick AWP, Falcon B, He S, Murzin AG, Murshudov G, Garringer HJ et al (2017) Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* 547:185–190. <https://doi.org/10.1038/nature23002>
26. Furman JL, Holmes BB, Diamond MI (2015) Sensitive detection of proteopathic seeding activity with FRET flow cytometry. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/53205>
27. Gallyas F (1971) Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 19:1–8
28. Gomes LA, Hipp SA, Rijal Upadhaya A, Balakrishnan K, Ospitalieri S, Koper MJ et al (2019) A β -induced acceleration of Alzheimer-related τ -pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathol* 138:913–941. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02053-5>
29. Grignon Y, Duyckaerts C, Bennece M, Hauw J-J (1998) Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 95:395–406
30. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci* 83:4913–4917. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4913>
31. Gundersen HJ, Osterby R (1981) Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or “do more less well!”. *J Microsc* 121:65–73
32. Guo JL, Narasimhan S, Changolkar L, He Z, Stieber A, Zhang B et al (2016) Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *J Exp Med* 213:2635–2654. <https://doi.org/10.1084/jem.20160833>
33. Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185
34. Hauw J, Feske S, Amarenco P, De Girolami U (2019) Vascular pathology. In: Gray F, Duyckaerts C, De Girolami U (eds) *Manual of basic neuropathology*, 6th edn. Oxford University Press, Oxford, pp 82–121
35. He Z, Guo JL, McBride JD, Narasimhan S, Kim H, Changolkar L et al (2017) Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat Med* 24:29–38. <https://doi.org/10.1038/nm.4443>
36. Héraud C, Goufak D, Ando K, Leroy K, Suain V, Yilmaz Z et al (2014) Increased misfolding and truncation of tau in APP/PS1/tau transgenic mice compared to mutant tau mice. *Neurobiol Dis* 62:100–112. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.09.010>
37. Hervé D, Porché M, Cabrejo L, Guidoux C, Tournier-Lasserre E, Nicolas G et al (2018) Fatal A β cerebral amyloid angiopathy 4 decades after a dural graft at the age of 2 years. *Acta Neuropathol* 135:801–803. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1828-9>
38. Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, Yamasaki TR, Mirbaha H, Eades WC et al (2014) Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(41):E4376–E4385. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411649111>

39. Hu W, Zhang X, Tung YC, Xie S, Liu F, Iqbal K (2016) Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. *Alzheimer's Dement* 12:1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.014>
40. Iba M, McBride JD, Guo JL, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2015) Tau pathology spread in PS19 tau transgenic mice following locus coeruleus (LC) injections of synthetic tau fibrils is determined by the LC's afferent and efferent connections. *Acta Neuropathol* 130:349–362. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1458-4>
41. Jaunmuktane Z, Mead S, Ellis M, Wadsworth JDF, Nicoll AJ, Kenny J et al (2015) Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature* 525:247–250. <https://doi.org/10.1038/nature15369>
42. Jaunmuktane Z, Quaegebeur A, Taipa R, Viana-Baptista M, Barbosa R, Koriath C et al (2018) Evidence of amyloid- β cerebral amyloid angiopathy transmission through neurosurgery. *Acta Neuropathol* 135:671–679. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1822-2>
43. Kovacs GG, Lutz MI, Ricken G, Ströbel T, Höftberger R, Preusser M et al (2016) Dura mater is a potential source of A β seeds. *Acta Neuropathol* 131:911–923. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1565-x>
44. Lewis J, Dickson DW, Lin W, Chisholm L, Corral A, Jones G et al (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant Tau and APP. *Science* 293:1487–1491
45. Mann DMA, Hardy J (2013) Amyloid or tau: the chicken or the egg? *Acta Neuropathol* 126:609–613. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1162-1>
46. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor J-P, Weintraub D et al (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 89:88–100. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004058>
47. Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E et al (2006) Exogenous induction of cerebral β -amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781–1784. <https://doi.org/10.1126/science.1131864>
48. Mirbaha H, Chen D, Morazova OA, Ruff KM, Sharma AM, Liu X et al (2018) Inert and seed-competent tau monomers suggest structural origins of aggregation. *Elife* 7:e36584. <https://doi.org/10.7554/eLife.36584>
49. Plowey ED, Ziskin JL (2016) Hippocampal phospho-tau/MAPT neuropathology in the fornix in Alzheimer disease: an immunohistochemical autopsy study. *Acta Neuropathol Commun* 4:114. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0388-2>
50. Pooler AM, Polydoro M, Maury EA, Nicholls SB, Reddy SM, Wegmann S et al (2015) Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 3:14. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0199-x>
51. Ritchie DL, Adlard P, Peden AH, Lowrie S, Le Grice M, Burns K et al (2017) Amyloid- β accumulation in the CNS in human growth hormone recipients in the UK. *Acta Neuropathol* 134:221–240. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1703-0>
52. Saito T, Mihira N, Matsuba Y, Sasaguri H, Hashimoto S, Narasimhan S et al (2019) Humanization of the entire murine Mapt gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *J Biol Chem* 294:12754–12765. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009487>
53. Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ (1991) Comparative epitope analysis of neuronal cytoskeletal proteins in Alzheimer's disease senile plaque neurites and neuropil threads. *Lab Invest* 64:352–357
54. Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:595–608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>
55. Sharma AM, Thomas TL, Woodard DR, Kashmer OM, Diamond MI (2018) Tau monomer encodes strains. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.37813>
56. Snedecor G, Cochran W (1980) *Statistical methods*, 7th edn. Iowa State University Press, Ames, pp 290–291
57. Takeda S, Wegmann S, Cho H, DeVos SL, Commins C, Roe AD et al (2015) Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nat Commun* 6:8490. <https://doi.org/10.1038/ncomms9490>
58. Tardivel M, Bégard S, Bousset L, Dujardin S, Coens A, Melki R et al (2016) Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies. *Acta Neuropathol Commun* 4:117. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>
59. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791–1800
60. Thierry M, Marty S, Boluda S, Duyckaerts C (2017) Alzheimer's senile plaque as shown by microcryodissection, a new technique for dissociating tissue structures. *J Neural Transm* 124:685–694. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1718-7>
61. Uchihara T, Kondo H, Ikeda K, Kosaka K (1995) Alzheimer-type pathology in melanin-bleached sections of substantia nigra. *J Neurol* 242:485–489
62. Vann SD, Aggleton JP (2004) The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat Rev Neurosci* 5:35–44. <https://doi.org/10.1038/nrn1299>
63. Vergara C, Houben S, Suain V, Yilmaz Z, De Decker R, Vanden Dries V et al (2019) Amyloid- β pathology enhances pathological fibrillary tau seeding induced by Alzheimer PHF in vivo. *Acta Neuropathol* 137:397–412. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1953-5>
64. von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow E-M, Mandelkow E (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci* 97:5129–5134. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5129>
65. Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Krüger L, Irsen S, Tepper K et al (2017) The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* 12:5. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0143-y>
66. Weibel ER (1979) *Stereological methods, vol. 1: practical methods for biological morphometry*. Academic, London

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