

Université de Montréal

**Le rôle de la protéine tau dans la mort des cellules ganglionnaires de  
la rétine : cas du glaucome et de la maladie d'Alzheimer**

Par

MARIUS TRÉSOR CHIASSEU MBEUMI

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Pathologie et Biologie Cellulaire

Août 2016

© Marius Trésor Chiasseu Mbeumi

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse de doctorat intitulée :

**« Le rôle de la protéine tau dans la mort des cellules ganglionnaires  
de la rétine : cas du glaucome et de la maladie d'Alzheimer »**

Présentée par :

Marius Trésor CHIASSEU MBEUMI

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alex Parker, Ph.D

Président-rapporteur

Adriana Di Polo, Ph. D.

Directeur de recherche

Jean-Daniel Arbour, M.D

Membre du jury

Emmanuel Planel, Ph. D.

Examineur externe

Richard Robitaille, Ph. D.

Représentant du doyen de la FES

## RÉSUMÉ

La protéostasie désigne l'ensemble de stratégies développées par la cellule pour assurer la préservation de son protéome. Parmi celles-ci on peut citer le contrôle du repliement, de la concentration, et de la distribution des protéines. Les neurones en raison de leur importante activité métabolique représentent une population cellulaire particulièrement vulnérable à l'altération de la protéostasie, auquel cas on parle de protéinopathie. C'est notamment le cas des tauopathies et  $\beta$ -amyloïdopathies, deux troubles neurodégénératifs, respectivement caractérisés par le dysfonctionnement de la protéine tau et du peptide amyloïde- $\beta$  ( $A\beta$ ). La protéine tau par le biais de son état de phosphorylation contrôle la stabilisation des microtubules, tandis que l' $A\beta$  issu du clivage de l'APP (Amyloid Precursor Protein) serait impliqué dans la plasticité synaptique ; de telle sorte que l'altération du fonctionnement ou de la protéostasie de ces deux molécules engendre de graves troubles neuronaux.

Le glaucome, principale cause de cécité irréversible au monde, est une neuropathie dégénérative caractérisée par la perte spécifique des somas des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et de leurs axones dans le nerf optique. Bien que l'hypertension oculaire (HTO) soit le principal facteur de risque, on ignore la cause du glaucome raison pour laquelle il n'existe aucun remède contre la maladie. La maladie d'Alzheimer (MA), principale cause de démence, est caractérisée par la présence d'enchevêtrement neurofibrillaires formés de la protéine tau dans les neurones et de plaques séniles constitué d'agrégats d' $A\beta$  dans le parenchyme cérébral. De manière surprenante, de nombreuses études révèlent que le glaucome et la MA présentent de nombreux points communs. C'est ainsi que des agrégats d' $A\beta$  et de tau ont été trouvés dans les CGR de sujets atteints du glaucome. De même les sujets victimes de la MA présentent des déficits visuels et une dégénérescence des CGR. Vu l'importance de tau pour la physiologie

neuronale et son rôle de médiateur de la toxicité d'A $\beta$ , nous proposons l'hypothèse selon laquelle le dysfonctionnement de la protéine tau résulte en la perte des CGR.

Les résultats présentés dans cette thèse reposent sur deux modèles expérimentaux de neurodégénérescence : un modèle de glaucome dépendant de HTO chez les rats (modèle de Morrison) et le modèle 3xTg de la MA chez lequel les souris expriment des mutations dans la protéine tau et la voie A $\beta$  (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>SWE</sub>, Tau<sub>P301L</sub>). Chez ces animaux nous avons prélevé la rétine, le nerf optique et le cerveau, sur lesquels nous avons étudié l'expression, la distribution, et la neurotoxicité de tau par western blot, immunohistochimie et PCR quantitative. Nos résultats révèlent que comparativement aux contrôles sains, les rétines malades (glaucome et MA) présentent une accumulation de tau anormalement phosphorylée, tandis que son expression génique reste inchangée. Cette hausse de tau est la conséquence de sa relocalisation vers le compartiment somatodendritique et le segment axonal intrarétinien des CGR, ceci au détriment des axones myélinisés inclus dans le nerf optique. Nos données montrent que les CGR 3xTg présentent une baisse drastique du transport axonal antérograde, indiquant que l'altération de la distribution de tau pourrait être à la base de cette perte de fonction axonale. Finalement, nous démontrons que l'accumulation de tau dans la rétine malade provoque éventuellement la mort des CGR.

Au total, cette thèse démontre que les rétines atteintes du glaucome et de la MA présentent les manifestations cardinales des tauopathies à savoir l'accumulation, l'altération de la phosphorylation, et une distribution anormale de tau le tout culminant en la perte de fonction et la dégénérescence des CGR.



**MOTS CLÉS :** cellule ganglionnaire de la rétine, glaucome, Maladie d'Alzheimer, tau, neurotoxicité, transport axonal antérograde, protéostasie, tauopathie.

## SUMMARY

Proteostasis refers to a set of strategies developed by the cell to ensure the maintenance of its proteome. These strategies include the control of protein folding, the amount, and the distribution of the proteins. Neurons are endowed with a high metabolic rate and, as such, are highly vulnerable to alterations in proteostasis, a situation referred to as proteinopathy. Tauopathies and  $\beta$ -amyloidopathies are two such instances wherein tau and amyloid- $\beta$ , respectively, undergo dysfunction. Tau protein is a microtubule stabilising protein which function is regulated by its phosphorylation state, while A $\beta$  a product of the cleavage of APP (Amyloid Precursor Protein) which is thought to be involved in the regulation of synaptic plasticity. Therefore, functional or proteostatic alterations of these proteins result in harmful consequences for neurons.

Glaucoma, the main cause of irreversible blindness, is a degenerative optic neuropathy characterised by the selective loss of retinal ganglion cells (RGC) and their axons in the optic nerve. Although ocular hypertension (OHT) is the main risk factor for the development of glaucoma, the cause of the disease is still unknown. There is currently no cure for glaucoma and the only available treatment is to reduce OHT pharmacologically or surgically. Alzheimer's disease, the main cause of dementia, is characterized by the presence of neurofibrillary tangles made of tau protein in neurons and senile plaques made of A $\beta$  in the cerebral parenchyma. Intriguingly, several studies have shown that glaucoma and AD share several common features. For instance, aggregates of tau and A $\beta$  have been described in the retina of glaucoma subjects. Likewise, AD patients show visual defects associated with RGC degeneration. Mindful of the importance of tau for neuronal physiology, and of its role as mediator of A $\beta$  toxicity, we put forward the hypothesis that tau protein alterations leads to RGC dysfunction and death.

The results presented in this thesis were based on two experimental models of neurodegeneration: a model of OHT-dependent glaucoma in rats leading to RGC death (Morrison model), and the 3xTg model of AD wherein mice overexpress mutant forms of tau and A $\beta$  (PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>SWE</sub>, Tau<sub>P301L</sub>). Using these animals, we collected retina, optic nerve, and brains which we used to study tau expression, distribution and neurotoxicity by western blot, immunohistochemistry and real-time PCR. Our results show that, when compared to healthy controls, the diseased retina (glaucoma or AD) display accumulation of abnormally phosphorylated tau while its gene expression remains unchanged. The increase of retinal tau protein might result from the redistribution of the protein in the somatodendritic compartment and intraretinal axonal segment of RGCs at the expense of the extraocular axonal segment enclosed within the optic nerve. Our data also demonstrate that RGCs from 3xTg mice show a drastic reduction of anterograde axonal transport suggesting that missorted tau might underlie these functional deficits. Lastly, we demonstrate that tau accumulation in the diseased retina eventually promotes RGC death.

Altogether, this thesis demonstrates that the glaucomatous and AD retinas present the cardinal features of tauopathies including tau accumulation, altered phosphorylation, and mislocalization which contribute to RGC dysfunction and subsequent death.

**KEYWORDS:** retinal ganglion cell, glaucoma, Alzheimer's disease, tau, neurotoxicity, anterograde axonal transport, proteostasis, tauopathy.

## Table de matières

RÉSUMÉ .....	iii
SUMMARY .....	vi
TABLE DES MATIÈRES .....	viii
LISTE DES FIGURES .....	xvi
LISTE DES TABLEAUX .....	xviii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	ixx
REMERCIEMENTS .....	xxiii

<b>Chapitre I. Protéostasie et protéinopathies</b> .....	1
1.1. Introduction générale .....	2
1.2. La protéostasie .....	5
1.2.1. Le contrôle qualité des protéines .....	5
1.2.1.1. La problématique du repliement des protéines .....	5
1.2.1.2. Les protéines chaperonnes ou l'art de prévenir les liaisons dangereuses .....	7
a. Les molécules chaperonnes .....	9
b. Les chaperonines .....	11
1.2.2. Le contrôle de la quantité des protéines ou comment corriger les excès ----	11
1.2.2.1. Le système ubiquitine protéasome .....	12
1.2.2.2. L'autophagie sélective des agrégats protéiques .....	16
1.2.3. Le contrôle de la distribution des protéines : de l'importance d'être au bon endroit au bon moment .....	19
i) <i>La barrière à la diffusion</i> .....	21
ii) <i>Le filtrage du trafic cellulaire</i> .....	21
1.2.4. La protéostasie extracellulaire .....	23

1.3.	Les protéinopathies -----	28
1.3.1.	Protéine tau et tauopathies -----	28
1.3.1.1.	La protéine tau -----	28
a.	Transcription et épissage alternatif de tau -----	28
b.	Structure biochimique de tau -----	30
c.	Fonctions physiologiques de tau et effets modulateurs des modifications post-traductionnelles -----	32
d.	Distribution cellulaire de tau -----	34
1.3.1.2.	Les tauopathies -----	35
a.	Altérations pathologiques de tau -----	36
i)	<i>Modification du profil de phosphorylation</i> -----	36
ii)	<i>Changements de conformation et troncation</i> -----	37
iii)	<i>Altération de la distribution cellulaire</i> -----	38
b.	Mécanismes d'agrégation de tau -----	38
c.	Troubles de la protéostasie et accumulation de tau -----	42
i)	<i>Les protéines chaperonnes</i> -----	43
ii)	<i>Le SUP et le contrôle de la dégradation de tau</i> -----	43
iii)	<i>Troubles de l'autophagie</i> -----	45
iv)	<i>Altération de la répartition cellulaire de tau</i> -----	45
d.	Mécanismes de toxicité de tau -----	46
1.3.2.	Amyloïde-beta et $\beta$ -amyloidopathies -----	48
1.3.2.1.	L'APP et ses voies de protéolyse -----	49
a.	Clivage non amyloïdogénique de l'APP -----	51
b.	Clivage amyloïdogénique de l'APP -----	52
1.3.2.2.	Rôles physiologiques de l'APP et de ses métabolites -----	52
i)	<i>APP</i> -----	52
ii)	<i>APPs<math>\alpha</math></i> -----	53
iii)	<i>APPs<math>\beta</math></i> -----	53

iv)	<i>p3</i>	-----	53
v)	<i>Aβ</i>	-----	54
vi)	<i>AICD</i>	-----	54
1.3.2.3.	Les β-Amyloïdopathies	-----	55
a.	Agrégation de l'amyloïde-β	-----	55
i)	<i>Hyperactivité de la voie amyloïdogénique</i>	-----	56
ii)	<i>Hypoactivité de la voie non amyloïdogénique</i>	-----	57
b.	Déficits protéostatiques et accumulation de l'amyloïde-β	-----	57
c.	Mécanismes de toxicité de l'amyloïde-β	-----	59
1.3.3.	La vulnérabilité des neurones aux troubles de la protéostasie	-----	62
<b><u>Chapitre II. Glaucome et maladie d'Alzheimer</u></b>			-----
			64
2.1.	Le glaucome : quand les cellules ganglionnaires de la rétine sont perdues de vue	-----	65
2.1.1.	Définition et épidémiologie	-----	65
2.1.2.	Structure de la rétine	-----	66
2.1.3.	Manifestations cliniques et facteurs de risque du glaucome	-----	69
2.1.4.	Pression intraoculaire et glaucome	-----	71
2.1.4.1.	Formation et drainage de l'humeur aqueuse	-----	72
2.1.4.2.	Glaucome à angle ouvert	-----	73
2.1.4.3.	Glaucome à angle fermé	-----	74
2.1.4.4.	Glaucome à tension normale	-----	76
2.1.5.	Modèles expérimentaux du glaucome	-----	77

2.1.5.1.	Modèles de glaucome à angle ouvert -----	77
2.1.5.2.	Modèles de glaucome à angle fermé -----	78
2.1.5.3.	Modèles de glaucome à tension normale -----	80
2.1.6.	Mécanismes de mort cellulaire dans le glaucome -----	81
2.1.6.1.	Dégénérescence du soma des CGR -----	82
a.	Voies intrinsèques de l'apoptose -----	82
b.	Voies extrinsèques de l'apoptose -----	87
2.1.6.2.	Axonopathie -----	90
a.	Dégénérescence wallérienne -----	95
b.	Axonopathie distale -----	96
2.1.6.3.	Dysfonctionnements dendritiques -----	97
2.2.	Maladie d'Azheimer : mémoire d'une démence -----	100
2.2.1.	Définition et épidémiologie -----	100
2.2.2.	Manifestations cliniques et facteurs de risques -----	101
2.2.3.	Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer -----	102
2.2.3.1.	Modèles basés sur la pathologie amyloïde -----	102
2.2.3.2.	Modèles basés sur l'amyloïdopathie et la tauopathie -----	104
2.2.4.	Mécanismes pathophysiologiques de la MA -----	105
2.2.4.1.	Hypothèse de la cascade amyloïde -----	105
2.2.4.2.	La phase biochimique de la maladie d'Alzheimer -----	108
2.2.4.3.	La phase cellulaire de la maladie d'Alzheimer -----	110
a.	Perturbations de la transmission synaptique -----	110
b.	La gliose reactive -----	112

2.2.5.	Propagation de la MA -----	115
2.3.	Glaucome et maladie d'Alzheimer : une pathophysiologie commune? -----	119
2.3.3.	Pathologies alzheimeriennes dans la rétine glaucomateuse : une protéinopathie insolite -----	119
2.3.1.	Manifestations glaucomateuses dans la rétine alzheimerienne : quand l'oubli affecte la vue -----	120
2.4.	Problématique, hypothèse et objectifs de la thèse -----	122
2.4.1.	Problématique de la these -----	122
2.4.2.	Hypothèse de recherche -----	122
2.4.3.	Objectifs de la these -----	122
2.4.4.	Méthodologie expérimentale -----	123

Chapitre III. Premier Article

**Tau accumulation, altered phosphorylation, and missorting promote neurodegeneration in glaucoma -----**126

3.1.	ABSTRACT -----	127
3.2.	INTRODUCTION -----	128
3.3.	MATERIALS AND METHODS -----	130
3.3.1.	Experimental animals -----	130
3.3.2.	Induction of ocular hypertension -----	130
3.3.3.	Western blot analyses -----	131
3.3.4.	Retina and optic nerve immunohistochemistry -----	132
3.3.5.	Reverse transcription and quantitative real time PCR (qPCR) -----	133
3.3.6.	Short interfering RNA (siRNA) -----	133
3.3.7.	Quantification of RGC soma and axons -----	134



3.3.8.	Statistical analyses -----	135
3.4.	RESULTS -----	136
3.4.1.	Age modulates the expression and phosphorylation profile of retinal tau -----	136
3.4.2.	Ocular hypertension promotes retinal tau upregulation and epitope-dependent changes in phosphorylation -----	137
3.4.3.	Altered phosphorylation drives tau accumulation and oligomerization in glaucomatous retinas -----	139
3.4.4.	Tau accumulates in the RGC somatodendritic compartment in glaucoma -----	140
3.4.5.	Tau is markedly downregulated in optic nerve RGC axons in glaucoma -----	141
3.4.6.	Selective tau knockdown promotes survival of RGC soma and axons -----	142
3.5.	DISCUSSION -----	144
3.6.	REFERENCES -----	151
3.7.	FIGURES -----	166
3.8.	TABLE -----	171

Chapitre IV. Second article

	<b>Tau accumulation in the retina of a murine model of Alzheimer’s disease precedes brain pathology and promotes retinal ganglion cell dysfunction -----</b>	<b>179</b>
--	--	------------

4.1.	ABSTRACT -----	180
------	----------------	-----

4.2.	BACKGROUND	-----	181
4.3.	METHODS	-----	183
4.3.1.	Experimental animals	-----	183
4.3.2.	Western blot analyses	-----	184
4.3.3.	Retina and optic nerve immunohistochemistry	-----	185
4.3.4.	Reverse transcription and quantitative real time PCR (qPCR)	-----	185
4.3.5.	Axonal transport measurement	-----	186
4.3.6.	Quantification of RGC soma	-----	187
4.3.7.	Statistical analyses	-----	187
4.4.	RESULTS	-----	188
4.4.1.	Tau protein build up in the retina precedes accumulation in the brain	-----	188
4.4.2.	Retinal tau undergoes epitope-specific and age-dependent phosphorylation changes in AD	-----	189
4.4.3.	Tau accumulates in RGC somatodendritic compartment and intraretinal axons	-----	190
4.4.4.	Tau is depleted from RGC axons in 3xTg optic nerves	-----	191
4.4.5.	Anterograde axonal transport is impaired prior to neuronal death in AD	-----	192
4.5.	DISCUSSION	-----	193
4.6.	CONCLUSIONS	-----	197
4.7.	REFERENCES	-----	197
4.8.	FIGURES	-----	207

<b>Chapitre V. Discussions générales</b>	-----220
5.1 Contribution de la protéine tau à la perte des CGR	-----221
5.2 Altérations du profil de phosphorylation de tau dans la rétine glaucomateuse et alzheimerienne	-----221
5.3 Mécanismes d'accumulation de tau dans la rétine malade	-----224
5.4 Troubles de la protéostasie et pertes fonctionnelles chez les cellules ganglionnaires	-----228
5.5 Le glaucome comme tauopathie : implications thérapeutiques	-----233
5.6 Diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer : la protéine tau rétinienne pour y voir plus clair ?	-----236
5.7 Limites de l'étude	-----238
5.8 La rétine comme modèle d'étude des tauopathies : perspectives pour la recherche	-----240
5.9 Modèle récapitulatif et conclusion	-----244
<b>Bibliographie</b>	-----245
<b>Annexe A</b>	-----305
<b>Annexe B</b>	-----307

## Liste des figures

### Chapitre I

<b>Figure 1 : Mécanismes de contrôle de la protéostasie.</b>	-----6
<b>Figure 2 : Correction du repliement des protéines par les protéines chaperons.</b>	-----8
<b>Figure 3 : Cycle de fonctionnement de HSP70.</b>	-----10
<b>Figure 4 : Étapes du processus d'ubiquitination des protéines.</b>	-----13
<b>Figure 5 : Interactions chaperonne-SUP.</b>	-----14
<b>Figure 6 : Formation des agrésomes.</b>	-----17
<b>Figure 7 : Mécanismes d'agrégation.</b>	-----18
<b>Figure 8. Éléments constitutifs du SIA.</b>	-----20
<b>Figure 9 : Mécanismes d'action du SIA.</b>	-----22
<b>Figure 10. Voies de contrôle de la protéostasie extracellulaire.</b>	-----25
<b>Figure 11. Dérégulations de la protéostasie.</b>	-----27
<b>Figure 12. Épissage alternatif et isoformes de tau.</b>	-----29
<b>Figure 13. Structure et partenaires d'interactions de la protéine tau.</b>	-----31
<b>Figure 14. Changements de conformation de tau.</b>	-----37
<b>Figure 15. Processus d'agrégation de tau.</b>	-----42
<b>Figure 16. APP et ses voies de clivage.</b>	-----50

### Chapitre II.

<b>Figure 1. Structure de la rétine.</b>	-----66
<b>Figure 2. Observation microscopique d'une section de la rétine.</b>	-----68

<b>Figure 3. Segments du globe oculaire avec leur fluide respectif.</b>	71
<b>Figure 4. Formation et drainage de l'humeur aqueuse.</b>	73
<b>Figure 5. Anomalies de drainage de l'humeur aqueuse dans le glaucome.</b>	75
<b>Figure 6. Signalisation du BDNF et voies de survie intrinsèque des CGR.</b>	84
<b>Figure 7. Voies de signalisation proapoptotique de TNF<math>\alpha</math> et Fas.</b>	88
<b>Figure 8. Anatomie de la tête du nerf optique sain et glaucomateux.</b>	92
<b>Figure 9. Voies de dégénérescence Ca<sup>2+</sup>-dépendantes des axones des CGR.</b>	94
<b>Figure 10. Hypothèse de la phase biochimique et cellulaire de la MA.</b>	109

### Chapitre III

<b>Figure 1. Age modulates the expression and phosphorylation profile of retinal tau.</b>	172
<b>Figure 2. Ocular hypertension promotes retinal tau upregulation and epitope-dependent changes in phosphorylation.</b>	173
<b>Figure 3. Altered phosphorylation drives tau accumulation and oligomerization in glaucomatous retinas.</b>	174
<b>Figure 4. Tau accumulates in the RGC somatodendritic compartment in glaucoma.</b>	175
<b>Figure 5. Tau is downregulated in optic nerve RGC axons in glaucoma.</b>	176
<b>Figure 6. Intravitreal delivery of siRNA against tau downregulates retinal tau protein levels.</b>	177
<b>Figure 7. Selective tau knockdown promotes RGC survival.</b>	178

## Chapitre IV

<b>Figure 1. Tau protein build up in the retina precedes accumulation in the brain.</b> -----	212
<b>Figure 2. Retinal tau undergoes epitope-specific and age-dependent phosphorylation changes in AD</b> -----	213
<b>Figure 3. Lack of conformational tau changes in AD retinas.</b> -----	214
<b>Figure 4. Tau accumulates in the somatodendritic compartment of RGCs.</b> -----	215
<b>Figure 5. Tau accumulates in RGC intraretinal axons.</b> -----	216
<b>Figure 6. Tau is depleted from RGC axons in transgenic optic nerves</b> -----	217
<b>Figure 7. Anterograde transport along RGC axons is impaired in 3xTg eyes.</b> -----	218
<b>Figure 8. Modest RGC loss is detected in the aging AD retinas.</b> -----	219

## Chapitre V

<b>Figure 1. Modèle récapitulatif de la thèse</b> -----	241
---	-----

## Annexe B

<b>Figure 1. L'hypertension oculaire engendre la hausse de l'expression de Fyn dans la rétine</b> -----	307
<b>Figure 2. La réduction de tau diminue l'expression de Fyn dans la rétine glaucomateuse.</b> -----	308

## **Liste des tableaux**

## Chapitre III

<b>Table 1. Tau knockdown promotes RGC soma and axon survival.</b> -----	171
--	-----

## Liste des abréviations

A $\beta$	Amyloïde-bêta
ADAM	A Disintegrin Metalloprotease
APH-1	Anterior PHarynx-defective 1
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
APP	Amyloid- $\beta$ Precursor Protein
APP-CTF $\alpha$	APP C-Terminal Fragment alpha
APP-CTF $\beta$	APP C-Terminal Fragment beta
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CCG	Couche de Cellules Ganglionnaires
Cdk5	Cyclin dependent kinase 5
CE	Chaperon Extracellulaire
CHIP	Carboxyl terminus of Hsc70 Interacting Protein
CFN	Couche de Fibres Nerveuses
CGR	Cellule ganglionnaire de la rétine
CNI	Couche Nucléaire Interne
CNE	Couche Nucléaire Interne
CPE	Couche Plexiforme Externe

CPI	Couche Plexiforme Interne
CREB	Cyclic AMP Response Element Binding Protein
DLMT	Domaine de Liaison Aux MicroTubules
DLT	Dépression à Long Terme
DFTP-17	Démence Fronto-Temporale avec Parkinsonisme lié au chromosome 17
DR6	Death Receptor 6
EAAC1	Excitatory Amino Acid Carrier 1
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Erk1/2	Extracellular Regulated Kinase 1/2
FADD	Fas-Associated Death Domain
FasL	Fas ligand
GLAST	GLutamate/Aspartate Transporter
GSK3- $\beta$	Glycogen Synthetase Kinase 3-Beta
HDAC 6	Histone Deacetylase 6
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
Hsc 70	Heat shock cognate protein of 70 kDa
HSP	Heat Shock Protein
HTO	HyperTension Oculaire
LAMP-2A	Lysosome-associated membrane protein 2A
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubule Associated Protein
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MARK	Microtubule Affinity Regulating Kinase)



MMSE	Mini-Mental Status Examination
MoCa	Montreal Cognitive Assessment
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NEF	Nucleotide Exchange Factor
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
NGF	Nerve Growth factor
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
Pen	Presenilin enhancer
PI3K	Phosphatidyl Inositol-3-Kinase
Pin1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA interacting 1
PLT	Potentialisation à Long Terme
PP1	Phosphatase 1
PP2A	Phosphatase 2A
PP2B	Phosphatase 2A
PS	Préséniline
PSD-95	Post-Synaptic Density 95
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SIA	Segment Initial de L'axone
SE	Segment Externe
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SNC	Système Nerveux Périphérique

SNP	Système Nerveux Périphérique
SR	Scavenger Receptor
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TNF $\alpha$	Tumor-Necrosis Factor-alpha
TNFR	TNF $\alpha$ Receptor
TRPV1	Transient receptor potential capsaicine-sensitive Vanilloid subunit 1)
Trk	Tropomyocin Receptor Kinase
WAVE1	Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin homologous protein 1

## Remerciements

Cette thèse, couronnement d'un parcours commencé il y a 5 ans, a été rendu possible grâce à mon superviseur, le Dr Adriana Di Polo, qui m'a offert l'opportunité de poursuivre des études en neurosciences dans son laboratoire de recherche. Guidé par ses enseignements, sa perspicacité scientifique, sa rigueur méthodologique, et surtout sa patience, moi humble étudiant, j'ai eu l'insigne honneur d'apporter ma modeste contribution à l'avancement des connaissances scientifiques sur la neurodégénérescence.

Je remercie profondément le Dr Nicole Leclerc, pour ses conseils, ses orientations, sa disponibilité. C'est notamment elle qui m'a introduit à l'univers de la protéine tau et qui de sa lanterne m'a éclairé sur les complexités de cette protéine fascinante. Je remercie aussi les Drs Fernandes et Doucet qui ont suivi avec attention durant mon cheminement doctoral et qui m'ont donné les conseils pour faire de mon projet de recherche un succès.

Merci, à mes collègues de laboratoire, passés et présents. Ali, et Jorge pour m'avoir appris la chirurgie du glaucome ; Ariel pour sa bonne humeur et sa disponibilité au laboratoire ; Barbara pour ses enseignements aux techniques expérimentales et son indéfectible soutien ; Jessica pour ses encouragements et ses conversations joviales, nos innombrables discussions m'ont notamment permis de murir plusieurs idées scientifiques présentées dans cette thèse ; Florence qui m'a fait bénéficier de sa grande et unique expertise technique ; Nico, Yoko et Luis qui du haut de leur expérience passée de doctorant m'ont apporté des éclairages scientifiques inestimables et m'ont servi d'exemple à suivre.

Au Dr Vande Velde et à Laurie qui ont collaboré à mes travaux de recherche, je suis profondément reconnaissant.

Mille remerciements à Vi, avec qui j'ai commencé mon parcours doctoral, et en la compagnie de qui j'ai découvert les arcanes de la protéine tau. C'est surtout au travers de mes échanges avec Vi que j'ai affiné mes connaissances sur la maladie d'Alzheimer.

Je tiens également à faire une mention spéciale pour Dr Desjardin du Laboratoire Leclerc, qui m'a appris des astuces et recettes de biochimie d'autant plus uniques qu'elles sont rarement décrites dans les articles de recherche.

Je voudrais exprimer ma gratitude la plus profonde à Clara pour sa générosité, son soutien, et l'écoute attentive qu'elle a su me fournir durant ces années.

Je remercie mes amis de longue date, le Dr. Takam Kamga Paul et Fokwa Soh Mathieu pour leurs exhortations et pour la saine émulation qu'ils m'ont procuré tout au long de mon cursus universitaire.

Je remercie mes mamans, Nathalie et Geneviève, pour leur amour inconditionnel et surtout pour la persévérance et le sens de l'abnégation qu'elles ont su m'inculquer, deux qualités qui m'ont aidé tout au long de mon doctorat.

Finalement, je remercie ma tendre Épouse Emmanuelle, pour sa patience, son soutien, ses encouragements sans limites. En m'insufflant la force de continuer lorsque la tâche semblait insurmontable, je puis dire rétrospectivement qu'elle a contribué considérablement à la réalisation de ce travail.

*A toi Papa,*  
*Qui m'a appris que le savoir est la plus précieuse des richesses,*  
*Qui a toujours cru en moi, même lorsque tout espoir semblait perdu,*  
*Qui ne t'est épargné aucune peine, aucun sacrifice pour développer mes aptitudes,*  
*Qui est parti trop tôt pour voir le fruit de tes longues et dures années de labeur,*  
*Cette thèse est un honneur à ta mémoire*

*« Tous les modèles sont faux, mais certains sont utiles »*

George Box

*« Lorsqu'elles sont bien formulées, les questions importent parfois plus que les réponses »*

Marius Chiasseu

Chapitre I.

**Protéostasie et protéinopathies**

## 1.1. Introduction générale

En 1837, Gerrit Jan Mulder réalisant l'analyse chimique de différentes substances albumineuses d'origine animale (albumine sérique, gélatine, fibrine) ou végétale (gluten) remarqua que ces préparations étaient toutes constituées à partir d'une même substance de base qu'il appela *Grundstoff*. Cette substance de base présentait une régularité remarquable dans sa composition chimique, avec comme éléments constitutifs le carbone, l'azote, l'oxygène le phosphore et le soufre. Berzelius dans l'une de ses correspondances avec Mulder datant du 10 juillet 1838, conseilla à ce dernier d'appeler cette nouvelle substance **protéine**, de la racine grecque *proteos* qui signifie primaire ou primordial. Ainsi Berzelius écrivait : « Le nom protéine que je vous propose pour l'oxyde organique de la fibrine et de l'albumine, je voulais le dérivé de *proteos* parce qu'il paraît être la substance primitive ou principale de la nutrition animale que les plantes préparent pour les herbivores que ceux-ci fournissent aux carnassiers » (Vickery, 1950).

Les progrès réalisés au cours des décennies suivantes notamment avec l'émergence de la biochimie comme discipline scientifique ont effectivement permis de confirmer que les protéines sont des macromolécules jouant un rôle de premier ordre dans le maintien des fonctions vitales. Bien au-delà des prédictions de Berzelius sur le caractère primordial des protéines pour la nutrition, ces macromolécules se sont révélées être les constituants essentiels d'une pléthore de molécules biologique aux rôles aussi divers qu'essentiels, dont ceux de protection (collagène, chitine), de catalyse (enzymes) de communication (hormones, neurotransmetteurs) de transport (hémoglobine, albumine) (Nelson et al., 2004). De même à l'intérieur de la cellule les protéines font partie intégrante de la cytoarchitecture (protéines d'échafaudage et cytosquelette), de la

transduction des signaux (voies de signalisation), de la régulation de l'expression génique (facteurs de transcriptions).

Il est remarquable de noter que les protéines présentent une telle diversité de fonctions alors qu'elles ne sont constituées que par l'agencement d'un nombre restreint d'unités constitutives, les acides aminés, dont on ne dénombre que 20 au total. Il se trouve que c'est la séquence de ces acides aminés qui détermine l'identité de la myriade de protéines existantes. Cette séquence est établie au cours de la première étape de synthèse protéique à partir de l'information stockée dans le gène, et aboutit à une chaîne polypeptidique linéaire correspondant à la structure primaire de la molécule.

Mais plus important encore, le rôle de la protéine en devenir est surtout tributaire de l'organisation spatiale ou tridimensionnelle de ses éléments constitutifs. Rappelons que la structure tridimensionnelle finale d'une protéine est la conformation la plus thermodynamiquement stable, lui permettant d'exercer sa fonction biologique. On peut citer comme exemples, la formation du site catalytique ou régulateur d'une enzyme, l'organisation du domaine de liaison au ligand pour un récepteur membranaire, la structuration de l'épitope antigénique d'un anticorps (Nelson et al., 2004). L'atteinte de la conformation finale par la protéine est l'aboutissement d'un processus complexe de maturation au cours duquel la protéine adoptera successivement sa structure secondaire (en hélices- $\alpha$  et feuillets- $\beta$ ), tertiaire (organisation de domaines hydrophobes, hydrophiles, acides) voire quaternaire (cas de protéines multimériques). Au terme de la maturation, on obtient une protéine native, c'est-à-dire prête à l'exercice de sa fonction physiologique.



On comprend donc que tout événement cellulaire susceptible d'altérer la conformation native d'une protéine ou sa concentration cellulaire aura un effet néfaste sur le fonctionnement de cette dernière et par ricochet un effet catastrophique sur la cellule. C'est afin de parer à de telles éventualités que la cellule a développé au cours de l'évolution un ensemble d'expédients lui permettant d'assurer l'homéostasie des protéines ; ces mécanismes sont désignés communément sous le terme de protéostasie. Le maintien de la protéostasie constitue une part très importante du métabolisme cellulaire, car il prévient l'émergence de la protéotoxicité consécutive à l'accumulation de protéines mal repliées ou anormalement ségréguées (Balch et al., 2008). Cette tâche est d'autant plus titanique lorsqu'il est question de cellules à forte activité métaboliques telles que les neurones. Malgré cela (ou plutôt à cause de cela), les neurones représentent une population cellulaire particulièrement vulnérable aux altérations de la protéostasie et ceci pour des raisons que nous évoquerons ultérieurement.

Un nombre substantiel de maladies neurodégénératives est caractérisé par un déséquilibre notoire entre la formation de protéines native et le développement d'agrégats de protéines mal repliées, ceci en faveur de ce dernier. Au nombre de ces maladies, on peut citer la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie de Creutzfeld-Jakobs, la sclérose latérale amyotrophique, pour ne mentionner que quelques-uns. Toutes ces maladies ont comme point commun la formation d'importants dépôts protéiques insolubles dans le système nerveux central (SNC), ce qui est indicateur d'un déséquilibre protéostatique (Yerbury et al., 2016). C'est d'ailleurs pour ces raisons que ces maladies sont encore désignées collectivement par le vocable révélateur de protéinopathies. C'est donc à juste titre qu'il est crucial de bien

comprendre les différents mécanismes impliqués dans la protéostasie afin de pouvoir mieux appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires associés aux protéinopathies.

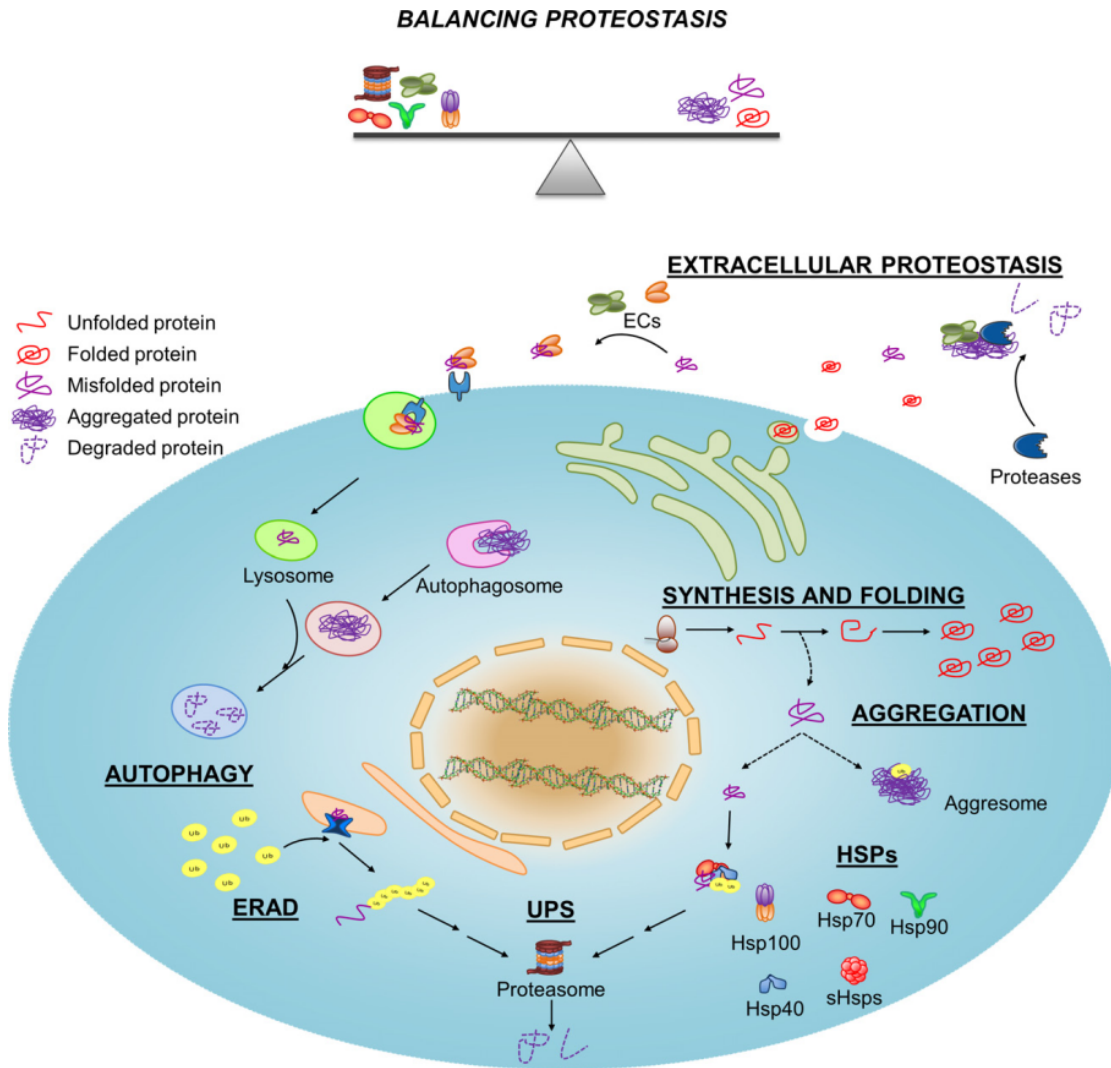
## **1.2. La protéostasie**

La protéostasie fait référence à la préservation par la cellule de l'ensemble de ses protéines dans la conformation, la concentration et la localisation requise pour son activité physiologique (Balch et al., 2008). Pour y parvenir, les cellules ont développé au cours de l'évolution de multiples mécanismes protéostatiques toutes aussi ingénieux les uns que les autres. Ces différents mécanismes (récapitulés dans la Figure 1) jouent un rôle majeur dans le bon fonctionnement de la cellule étant donné le caractère ubiquitaire des protéines à l'égard de la quasi-totalité des activités biologiques. Dans la présente section, il sera régulièrement fait mention de la cellule eucaryote, cependant il est important de garder en mémoire que tous les phénomènes décrits ci-dessous s'appliquent *a fortiori* aux neurones.

### **1.2.1. Le contrôle qualité des protéines**

#### **1.2.1.1. La problématique du repliement des protéines**

Au terme de la traduction, la chaîne polypeptidique nouvellement synthétisée se replie afin de prendre la conformation compatible avec l'activité de la protéine. Cette conformation finale est tributaire de la séquence primaire de la protéine, et sera modulée par les interactions physico-chimiques de la protéine avec le milieu environnant de manière à adopter la forme la plus énergétiquement favorable (Nelson et al., 2004).



**Figure 1 : Mécanismes de contrôle de la protéostasie.** Une fois traduite dans le cytosol ou dans le réticulum endoplasmique, les protéines sont correctement repliées par les protéines chaperonnes. Si les protéines ne parviennent pas à être corrigées, elles sont marquées par l'ubiquitine pour être dégradées par le protéasome. Lorsqu'elles persistent, les protéines mal repliées forment des amas insolubles dans la cellule. Ces inclusions intracellulaires sont alors détruites par autophagie ou par dégradation associée au réticulum endoplasmique. Dans le milieu extracellulaire, les protéines sécrétées par les cellules sont aussi contrôlées par les chaperonnes et protéases extracellulaires qui promeuvent l'endocytose des protéines anormales afin de permettre leur destruction dans les lysosomes. Au total, la protéostasie résulte de l'équilibre entre la formation/maintien de protéines natives et l'amoncellement de protéines mal repliées. Tiré de Yerbury et al. (2016).

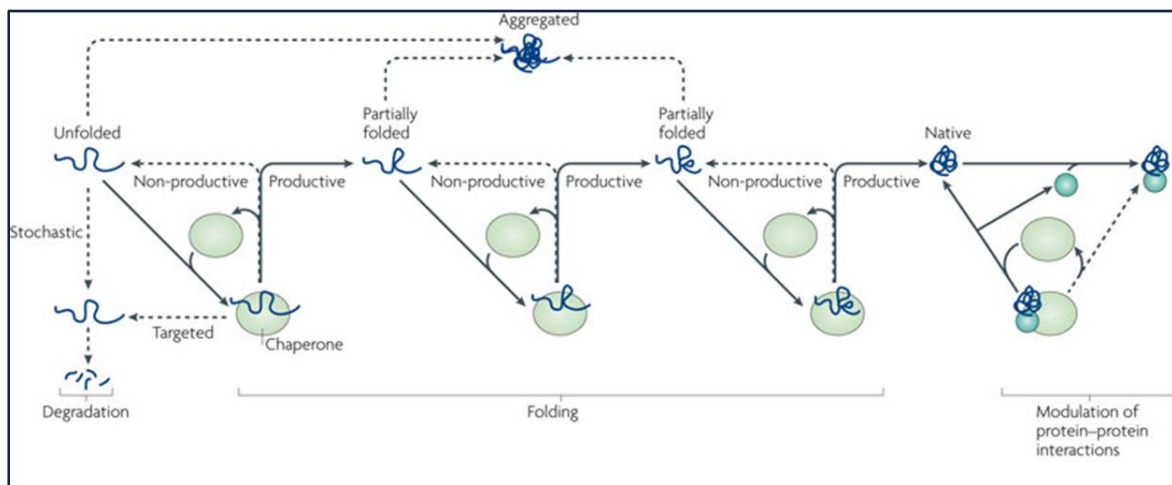
Ceci se fait notamment via la formation de liaisons inter et intramoléculaires (hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques, ponts disulfides). Autrement dit, lorsque les conditions ambiantes le permettent, l'atteinte par la protéine de sa conformation native se fait, en principe, spontanément.

Cependant lorsqu'il est question de longues chaînes peptidiques, le repliement s'il devait se faire uniquement de manière spontanée, se déroulerait trop lentement à l'échelle du métabolisme cellulaire. La conséquence serait une accumulation de protéines non fonctionnelles, toutes en attente de maturation ; ce qui pourrait s'avérer dangereux pour l'activité de la cellule. De plus, la protéine néoformée n'est pas à l'abri d'erreurs au cours du processus de maturation, car elle peut présenter des aberrations dans son organisation tridimensionnelle. En réalité, il est estimé que même dans des conditions normales 30 % des protéines nouvellement traduites sont mal repliées, donc non fonctionnelles (Princiotta et al., 2003). Enfin, des stress cellulaires tels que l'hyperthermie, les radicaux libres, et les variations de pH peuvent provoquer un changement de la conformation de protéines pourtant bien repliées jusqu'alors. C'est pour toutes ces raisons que les cellules ont développé des systèmes permettant d'accélérer le repliement correct des protéines et de corriger les erreurs y afférentes. Ce système est celui des protéines chaperonnes.

#### **1.2.1.2. Les protéines chaperonnes ou l'art de prévenir les liaisons dangereuses**

Comme leur nom l'indique, les protéines chaperonnes sont une classe de molécules qui aident les protéines à atteindre et à préserver leur conformation native, notamment en protégeant leurs interfaces contre des interactions non productives et en

rompant toute liaison moléculaire inappropriée lorsqu'elle survient (Kampinga and Craig, 2010; Saibil, 2013). Les protéines chaperonnes agissent sur leur protéine substrat en accélérant l'atteinte par ces derniers de la configuration spatiale compatible avec la fonction biologique qui leur est dévolue. À l'instar des enzymes, les chaperons demeurent distincts de leur substrat une fois la réaction de repliement achevée. Afin d'atteindre la conformation idoine, plusieurs itérations des étapes « liaison chaperon-substrat » et « séparation chaperon-substrat » peuvent être requises (Figure 2) (Kampinga and Craig, 2010).



**Figure 2 : Correction du repliement des protéines par les protéines chaperonnes.** Lorsqu'une protéine n'est pas proprement repliée, les protéines chaperonne interagissent avec cette dernière pour induire la formation d'interactions productives entre les différents domaines protéiques après quoi le chaperon se sépare de sa protéine cible. Ce processus est répété plusieurs fois jusqu'à ce que la protéine atteigne la conformation native. La protéine chaperon peut également reconnaître la protéine mal repliée et la cibler pour la voie de dégradation. Les protéines chaperon modulent aussi les interactions protéine-protéines. Tiré de Kampinga and Craig (2010).

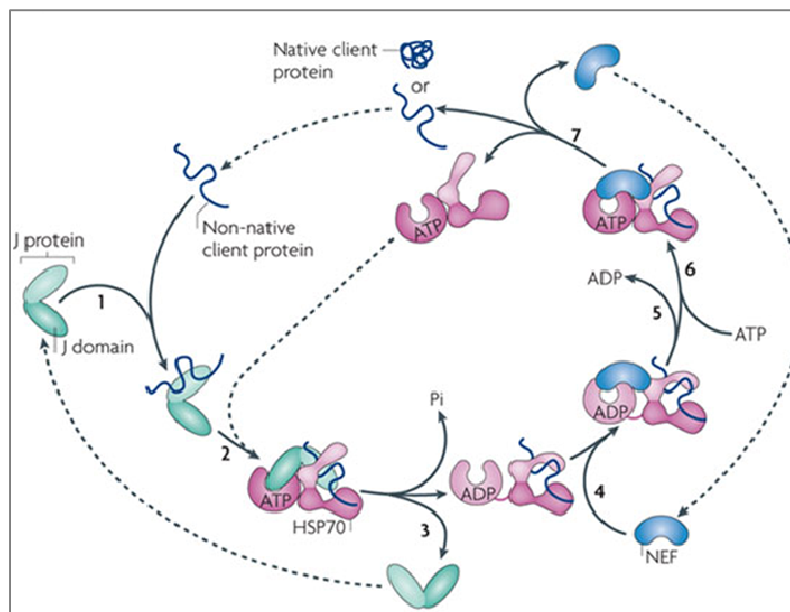
Néanmoins à l'inverse des enzymes, l'interaction chaperon/substrat ne repose pas sur une spécificité moléculaire *stricto sensu*, mais plutôt sur l'identification globale de motifs moléculaires le plus souvent de type hydrophobe (Kampinga and Craig, 2010). C'est ce qui explique qu'un nombre limité de protéines chaperonnes puisse guider et corriger le repliement de la pléthore de protéines exprimée par la cellule.

Chez les eucaryotes, les principales protéines chaperonnes sont les protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Protein), désignées ainsi parce que leur synthèse augmente après l'exposition de la cellule à de fortes températures (Saibil, 2013). Cette famille est subdivisée en deux groupes : les molécules chaperonnes et les chaperonines. Au nombre des chaperons moléculaires on dénombre l'HSP70, HSP90 et HSP100 tandis que la mieux caractérisée des chaperonines eucaryotiques est l'HSP60.

#### **a. Les molécules chaperonnes**

Des différents chaperons moléculaires, le plus abondant est l'HSP70 qui agit de concert avec deux cochaperons, l'HSP40 (ou protéine J) et le NEF (Nucleotide Exchange Factor) pour assurer le repliement correct des protéines. Cette intervention de l'HSP70 se fait très tôt dans le processus de maturation, quand la chaîne polypeptidique est encore en cours d'élongation dans le ribosome. Le processus de contrôle de la conformation est amorcé par HSP40 qui se lie à la chaîne polypeptidique immature, ce qui permet le recrutement d'HSP70 préalablement lié à l'ATP (Kampinga and Craig, 2010). Lorsqu'elle est liée à cette dernière, l'HSP70 prend une configuration ouverte et son domaine de liaison au substrat à caractère hydrophobe s'apparie temporairement à l'une des régions hydrophobes de la protéine naissante. HSP70 grâce à son activité ATPase,

hydrolyse l'ATP en ADP + Pi et l'énergie libérée permet au domaine de liaison au substrat de prendre une configuration fermée dans laquelle la région exposée de la protéine pourra se replier correctement. Ensuite, l'HSP40 se dissocie du complexe tandis que le NEF se fixe sur l'HSP70 afin de favoriser le remplacement de l'ADP par l'ATP. Finalement, l'HSP70 ayant de nouveau fixé l'ATP se dissocie du NEF afin de reprendre un autre cycle (Figure 3) (Kampinga and Craig, 2010).



**Figure 3 : Cycle de fonctionnement de HSP70.** (1) L'activité chaperonne de HSP70 est initié par la fixation du cochaperon HSP40 (ou protéine J dans l'illustration) à la protéine cible. (2) Ceci stimule la formation du complexe HSP40-HSP70-ATP. (3) La lyse de l'ATP permet la correction de conformation de la protéine par HSP70 tout en séparant HSP40 du complexe ; (4) ce qui conduit au recrutement de NEF. (5) Sous l'effet de ce dernier, l'ADP est éjecté du nouveau complexe (6) au profit de l'ATP. (7) Enfin le complexe se dissocie et la protéine corrigée est libérée tandis que HSP70 toujours lié à l'ATP devient disponible pour un autre cycle. Voir texte pour plus de détails. Tiré de Kampinga and Craig (2010).

Les autres molécules chaperonnes agissent suivant un schéma similaire à celui de l'HSP70 en utilisant leur activité ATPase pour s'apparier avec les domaines hydrophobes de leurs protéines client, avec cependant quelques particularités spécifiques. HSP90 par exemple assure principalement la stabilisation et la maturation des récepteurs des stéroïdes et des protéines kinases (Saibil, 2013). L'HSP100 pour sa part agit en synergie avec l'HSP70 et l'HSP40 pour désagréger et déplier les protéines afin de permettre leur correction (Shorter, 2011; Lander et al., 2012). Cette réponse intervient lorsqu'une protéine s'agrège ou subit une altération de sa conformation native comme lorsqu'elle est soumise à un stress cellulaire (hyperthermie, stress oxydatif). La protéine ainsi modifiée retrouve sa structure primaire et pourra être ensuite repliée correctement, cette fois avec l'aide des chaperonnes.

#### **b. Les chaperonnes**

Contrairement aux molécules chaperonnes, les chaperonnes à l'instar de l'HSP60, interviennent uniquement sur la protéine totalement traduite et séparée des ribosomes. HSP60 est un assemblage macromoléculaire dont la forme en tonneau permet d'englober totalement la protéine cible. Ce qui permet à cette dernière de se replier correctement par le truchement des interactions de ses domaines hydrophobes avec la paroi intérieure également hydrophobe de l'HSP60, un processus régulé par la cochaperonine HSP10 et qui se déroule également en présence de l'ATP (Alberts et al., 2011; Lodish et al., 2013).

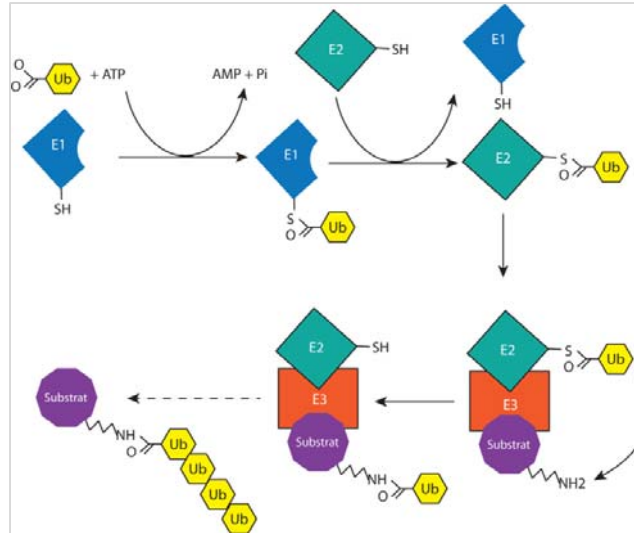
#### **1.2.2. Le contrôle de la quantité des protéines ou comment corriger les excès**



Il peut arriver que des protéines restent anormalement repliées, et ce en dépit de tous les efforts de correction déployée par la cellule. Dans ce cas de figure, les protéines restent non fonctionnelles et s'accumulent dans le cytosol ou dans les organites. Il est avéré que de tels amoncellements de protéines non natives sont toxiques dans la mesure où ils interfèrent avec le fonctionnement de la machinerie cellulaire. Afin de prévenir une telle occurrence, la cellule utilise une seconde ligne de défense pour préserver l'homéostasie de son protéome à savoir la dégradation des protéines mal repliées par le système ubiquitine-protéasome (SUP).

#### **1.2.2.1. Le système ubiquitine-protéasome**

Le SUP fait référence au complexe moléculaire qui assure la dégradation des protéines intracellulaires chez les eucaryotes. Le SUP est constitué des 3 enzymes responsables de l'ubiquitination du substrat, et du protéasome 26S. Ces molécules fonctionnent suivant un processus séquentiel hautement coordonné (Alberts et al., 2011; Lodish et al., 2013). La protéolyse est initiée par l'addition ATP-dépendante de l'ubiquitine à l'enzyme activatrice (E1) formant une liaison thioester avec cette dernière. Ensuite, la molécule d'ubiquitine est transférée d'E1 à l'enzyme conjugante E2 toujours via la formation d'une liaison thioester. Enfin, l'ubiquitine est transmise à un résidu lysine ou à l'extrémité N-terminale de la protéine substrat en formant cette fois une liaison peptidique, une réaction catalysée par l'ubiquitine ligase (E3). Ces trois étapes sont répétées plusieurs fois, chaque nouvelle molécule d'ubiquitine s'ajoutant au précédent de manière à former une chaîne polyubiquitinée sur la protéine substrat (Figure 4) (Gong et al., 2016).

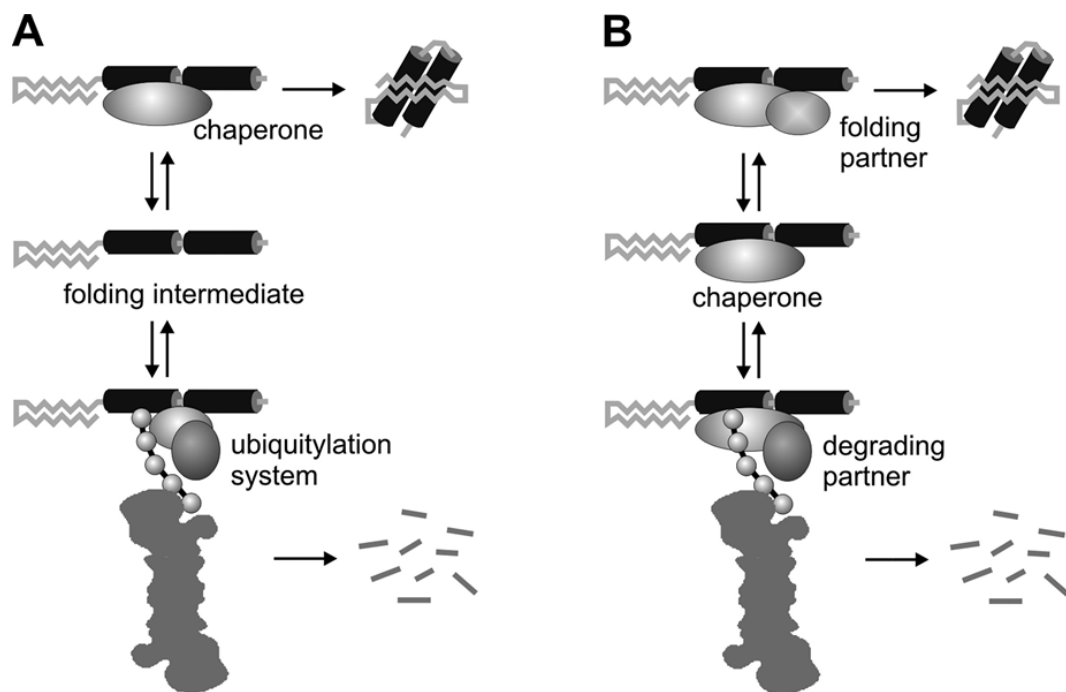


**Figure 4 : Étapes du processus d'ubiquitination des protéines.** L'ubiquitination des protéines-substrats du protéasome est l'aboutissement d'un processus s'effectuant en plusieurs étapes et catalysé successivement par E1 (enzyme activatrice), E2 (enzyme conjugante) et E3 (ubiquitine ligase). Reproduit à partir de Gong et al. (2016).

La polyubiquitination de la protéine substrat sert de signal au protéasome qui va assurer la lyse de cette dernière, libérant de courts fragments peptidiques de 7 à 8 acides aminés et les molécules d'ubiquitine. Le SUP par son activité protéolytique permet de sauvegarder la cellule des effets délétères que les protéines mal repliées, ou altérées pourraient avoir sur elle. Comment s'effectue l'identification des protéines à détruire par le SUP ?

La solution réside encore une fois chez les protéines chaperonnes. En effet ces molécules ne sont pas seulement limitées au contrôle de la conformation des protéines, elles interviennent également pour diriger les protéines mal repliées ou endommagées vers la voie de dégradation du SUP (Patterson and Höhfeld, 2008). Lorsqu'une protéine mal repliée demeure réfractaire à toute correction par les chaperons, ces derniers restent liés à la protéine afin de la maintenir soluble dans le cytosol; cet état soluble facilite

l'identification des protéines non natives par le SUP (Figure 5A). Parallèlement, les chaperons HSP70 et HSP90 peuvent jouer un rôle direct dans la dégradation des protéines non natives en recrutant le cochaperon CHIP (carboxyl terminus of Hsc70 interacting protein). CHIP présente la particularité d'avoir une activité ubiquitine ligase, ce qui lui permet d'orienter la protéine anormale vers le protéasome pour dégradation (Figure 5B). Il est intéressant de noter que CHIP est fortement exprimé dans les tissus à forte activité métabolique dont le cerveau (McDonough and Patterson, 2003).



**Figure 5 : Interactions chaperon-SUP.** Les chaperons régulent la dégradation des protéines par le SUP via deux mécanismes potentiels. A) Le chaperon reconnaît la protéine mal repliée et la solubilise de manière à faciliter l'interaction avec le SUP. B) Le chaperon lorsqu'il est doté d'une activité ubiquitine ligase intrinsèque assure l'ubiquitination de la protéine mal repliée en prélude à sa dégradation protéasomale. Tiré de Patterson and Höhfeld (2008).

Lorsque les circonstances l'exigent, comme lors d'une exposition à une forte température ou à des agents dénaturants, la cellule active l'HSF-1 (heat shock transcription factor 1). Celui-ci stimule la transcription des gènes codant pour les

protéines chaperonnes afin d'amplifier les réponses décrites précédemment et de rétablir rapidement la protéostasie. La dégradation des protéines anormalement formées se déroule également dans la lumière du réticulum endoplasmique, on parle dans ce cas de dégradation associée réticulum endoplasmique (Figure 1). La différence ici est que les protéines ciblées doivent être préalablement transloquées à travers la bicouche lipidique vers le cytosol afin d'y être dégradées par le SUP (Olzmann et al., 2013).

Il faut également souligner qu'au-delà de leur implication dans la dégradation des protéines mal repliées, le SUP peut également intervenir plus précocement sur la protéine naissante notamment par le biais de l'ubiquitination co-translationnelle. Cette intervention qui consiste à joindre des chaînes polyubiquitinées sur la chaîne peptidique tandis qu'elle est encore en cours d'élongation dans le ribosome vise à dégrader rapidement les protéines présentant des anomalies, ôtant à celles-ci toute possibilité de s'agglomérer dans la cellule (Wang et al., 2013).

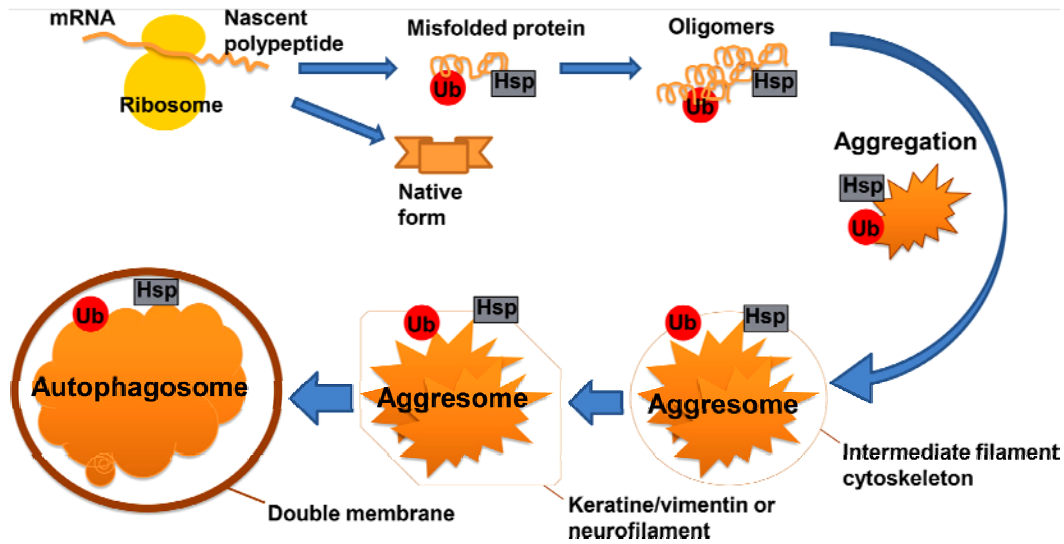
Certaines protéines bien que correctement repliées doivent néanmoins être dégradées par le SUP. C'est par exemple le cas des protéines à expression constitutive, dont la lyse régulière permet de maintenir la constance de leur niveau cellulaire. Il peut aussi advenir que les protéines nécessitent d'être recyclées suite à la baisse de leur activité biologique causée par l'usure du temps. *In fine*, le SUP participe au contrôle de la protéostasie en prévenant l'accumulation des protéines dans le cytoplasme.

Il se trouve qu'en dépit de la pléiade de mesures prises par la cellule pour s'assurer du maintien des protéines dans la bonne conformation, ou de leur destruction lorsqu'elles sont mal repliées, les protéines défectueuses peuvent continuer à s'accumuler dans le cytoplasme. Cela peut advenir lorsqu'une mutation génique cause la formation

d'une protéine anormale incapable de se replier correctement, peu importe les efforts de correction entrepris par les chaperons. Résultat, au fil des ans les protéines s'agrègent et forment des inclusions cytoplasmiques résistantes à la dégradation par le protéasome. Cette incapacité du protéasome à détruire de grandes masses protéiques s'explique par sa structure moléculaire en forme de cylindre qui ne peut admettre qu'une protéine à la fois pour la lyse (Alberts et al., 2011; Lodish et al., 2013). Lorsque la cellule est confrontée à ce type de situation, elle utilise son ultime ligne de défense pour préserver la concentration du pool de protéines, à savoir l'autophagie.

#### **1.2.2.2. L'autophagie sélective des agrégats protéiques**

L'autophagie est le phénomène par lequel les cellules détruisent les éléments de leur cytoplasme en les isolants dans des vésicules à double membrane (autophagosomes) pour ensuite les fusionner avec des lysosomes pour dégradation (Lee et al., 2013). Le terme agréphagie a été proposé pour désigner l'autophagie lorsqu'elle vise sélectivement à la destruction des agrégats cytosoliques de protéine encore appelés agrésomes. Mais avant de parler en détail de la notion d'agréphagie, il est important pour la clarté de notre propos de discuter brièvement de la genèse des agrésomes. La formation des agrésomes débute lorsque des inclusions de protéines anormalement repliées et résistantes au protéasome se forment dans le cytosol. Ces inclusions préalablement ubiquitinées sont ensuite encerclées par la vimentine/kératine (ou les neurofilaments dans le cas des neurones). Les agrésomes sont finalement transportés de manière rétrograde par la dynéine en direction du centre organisateur des microtubules pour y être encapsulés dans des vésicules produisant ainsi des autophagosomes (Figure 6) (Hyttinen et al., 2014).

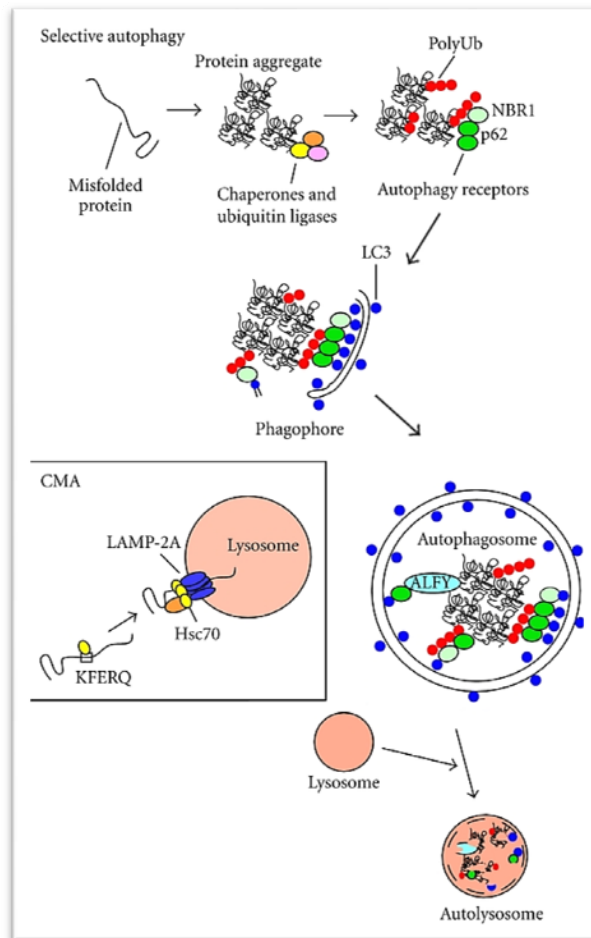


**Figure 6 : Formation des agrésomes.** Lorsque la quantité de protéines mal repliées augmente, ces derniers s'oligomérisent pour former des agrégats ubiquitinés et liés aux HSP. Ces amas protéiques sont encerclés par les filaments intermédiaires pour produire des agrésomes qui seront ensuite circonscrits par des vésicules d'autophagie pour former des autophagosomes. Tiré de Hyttinen et al. (2014).

Le processus de formation des autophagosomes débute lorsque que les agrésomes préalablement ubiquitinés fixent les récepteurs de l'autophagie tels que p62, NRB1, et optineurine (Lim and Yue, 2015). Ces récepteurs en interagissant avec le ligand LC3 présent sur la membrane des phagophores, stimulent l'englobement des agrésomes par les phagophores (Figure 7). La circonscription des agrésomes par des vésicules offre l'avantage d'isoler les inclusions protéiques insolubles et de limiter les effets délétères que leur accumulation pourrait avoir sur la cellule (Lim and Yue, 2015). Ultiment, l'agrèphagie est complétée par la fusion des autophagosomes avec les lysosomes pour former un autophagolysosome ou autolysosome dans lequel les agrégats de protéines seront complètement détruits par lyse enzymatique.

Les lysosomes peuvent aussi dégrader les protéines mal repliées sans avoir à fusionner avec les autophagosomes grâce au mécanisme d'autophagie assistée par les

chaperons. Au cours de ce processus, les substrats protéiques mal repliés et dotés du motif KFERQ, que reconnaît la protéine chaperon Hsc70 (heat shock cognate protein of 70KDa), se lient au récepteur lysosomal LAMP-2A ce qui déclenche leur entrée dans le lysosome pour dégradation (Lim and Yue, 2015). Les lysosomes par le biais l'autophagie assistée par les chaperons constituent donc une voie alternative de dégradation des protéines mal repliées (Figure 7).



**Figure 7 : Mécanismes d'agrégation.** Les dépôts protéiques polyubiquitinés auxquels sont liés les ligands p62 et NBR1 sont reconnus par le récepteur de l'autophagie LC3, induisant ainsi la formation de la vésicule d'autophagie. Cette vésicule fusionnera ensuite avec le lysosome afin de dégrader les agrégats. Dans l'autophagie assistée par les chaperons (AAC), la protéine cible liée au chaperon Hsc70 est introduite dans le lysosome via le récepteur LAMP-2A pour y être lysée. Modifiée de Lim and Yue (2015).

### **1.2.3. Le contrôle de la distribution des protéines : de l'importance d'être au bon endroit au bon moment**

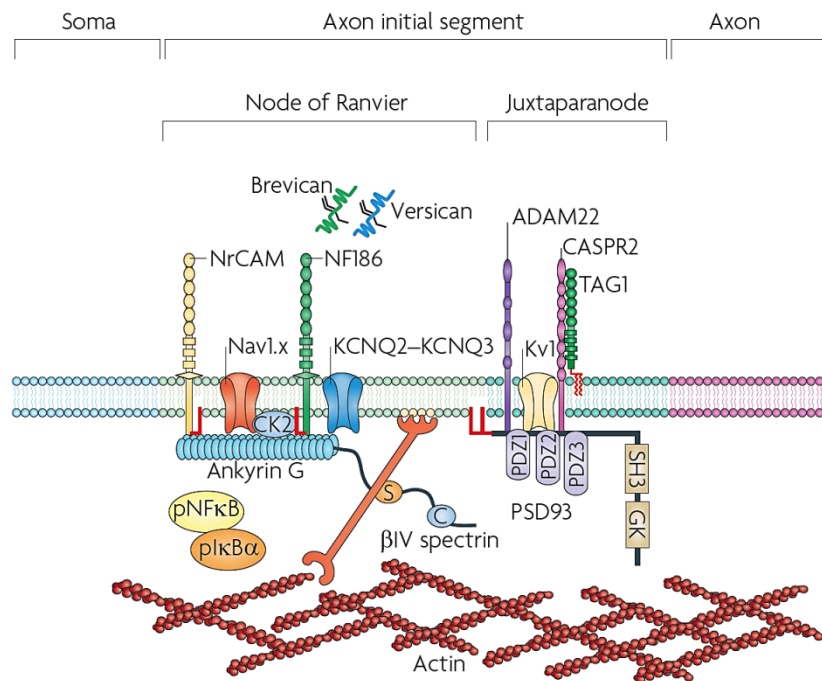
Les protéines même correctement repliées peuvent être nocives si elles ne se trouvent pas dans le compartiment cellulaire adéquat. Il est donc primordial pour la cellule que les protéines qu'elle synthétise soient bien réparties entre les différents segments intracellulaires ou sécrétées dans le milieu extracellulaire le cas échéant. Cette tâche incombe au système de la protéostasie. La répartition des protéines est d'autant plus cruciale lorsque la cellule présente une organisation polarisée. Le neurone constitue le prototype par excellence de polarisation cellulaire, puisqu'il est doté d'un compartiment somatodendritique et d'un compartiment axonal. Cette polarisation est également fonctionnelle avec d'une part le segment somatodendritique qui fait office de pôle récepteur de l'influx nerveux et d'autre part le segment axonal qui joue le rôle de pôle émetteur. Il est évident qu'une telle dichotomie morphologique et fonctionnelle nécessite une ségrégation stricte du pool de protéines, laquelle doit être étroitement monitorée tout au long de la vie du neurone. Curieusement, c'est dans le compartiment somatodendritique que se trouve la machinerie cellulaire nécessaire à la traduction des protéines. Il en résulte donc que le neurone doit prendre des mesures spéciales pour s'assurer de la répartition correcte des protéines entre les différents compartiments cellulaires une fois la synthèse terminée.

À titre d'exemple, tau et MAP2 deux protéines membres de la famille des MAP (Microtubule Associated Protein) ont une localisation différentielle, avec MAP2 localisée principalement dans les dendrites, et tau exprimée essentiellement au niveau des axones (Dehmelt and Halpain, 2004). Certes, il a été montré que dans certaines conditions la



production des protéines nécessaires au fonctionnement des axones, peut aussi avoir lieu localement (Giuditta et al., 2008). Néanmoins, il n'en demeure pas moins que l'essentiel du protéome axonal est traduit dans le compartiment somatodendritique puis acheminé vers les axones.

Afin donc d'assurer cette répartition différentielle des protéines, le neurone dispose d'une zone spécialisée située à la jonction entre le corps cellulaire et l'axone qu'on appelle segment initial de l'axone (SIA) ou cône d'émergence. Le SIA est constitué par l'agencement de protéines d'échafaudage, de molécules d'adhésion cellulaire, de canaux ioniques voltages-dépendant, de protéines de la matrice extracellulaire et de molécules d'actine (Figure 8) (Rasband, 2010).



**Figure 8. Éléments constitutifs du SIA.** Le SIA est composé sur sa face extracellulaire de l'ectodomaine des molécules d'adhésion cellulaire ; sur son versant intracellulaire il renferme plusieurs protéines d'échafaudage parmi lesquels l'ankyrine G (la plus importante pour sa fonction), la spectrine, et les filaments d'actine polymérisés. Le SIA contient aussi une forte densité de canaux sodiques et potassiques nécessaire à l'initiation du potentiel d'action. Modifié de Rasband (2010).

De tous les constituants du SIA, le plus important pour son assemblage et son fonctionnement est sans nul doute la protéine d'échafaudage Ankyrine G (AnkG), puisque c'est elle qui permet le recrutement des autres éléments du SIA au cours du développement (Zhou et al., 1998; Jenkins and Bennett, 2001), tandis que sa suppression chez le neurone adulte engendre la désorganisation du SIA et la perte de la polarité neuronale (Hedstrom et al., 2008).

Comment le SIA régule-t-il la distribution des protéines dans le neurone ? Des études ont montré que le SIA agit via deux mécanismes distincts, à savoir la formation d'une barrière de diffusion et le filtrage du trafic cellulaire (Leterrier and Dargent, 2014).

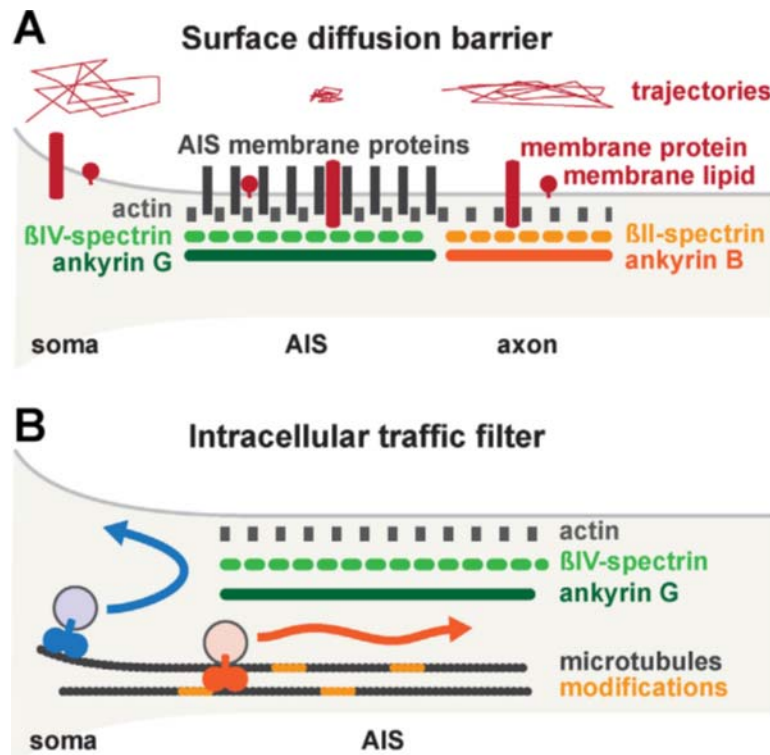
*i) La barrière à la diffusion*

L'existence d'une très forte densité de protéines membranaires dans le SIA et la présence sur sa face intracellulaire d'un important réseau de protéines d'échafaudage reliées aux filaments d'actine et aux microtubules créent une véritable barrière physique à la diffusion des protéines entre les parties somatodendritique et axonale (Leterrier and Dargent, 2014). Une telle barrière physique en assurant le cloisonnement desdits compartiments limite considérablement les échanges stochastiques et préserve la ségrégation protéique établie par le neurone lors de sa maturation (Figure 9A).

*ii) Le filtrage du trafic cellulaire*

Le SIA régule le flux directionnel du cargo cellulaire en empêchant le passage antérograde de vésicules transportant les protéines somatodendritiques en direction des axones, tout en permettant le passage bidirectionnel de vésicules contenant des protéines

axonales (Burack et al., 2000; Al-Bassam et al., 2012). Le SIA fait également office de filtre puisqu'il peut restreindre le passage de cargos cellulaires en fonction de leur taille ou de l'efficacité de leur moteur moléculaire (Song et al., 2009) (Figure 9B).



**Figure 9 : Mécanismes d'action du SIA.** (A) Le SIA forme une barrière de diffusion qui restreint le passage des protéines entre le compartiment axonal et somatodendritique. (B) Le SIA régule aussi le passage préférentiel des protéines de manière antérograde vers les axones ou rétrograde vers le soma et les dendrites. Modifié de Leterrier and Dargent (2014).

Le contrôle de la distribution d'une protéine peut aussi être assuré par le système de dégradation des protéines (protéasome, autophagie) qui peuvent par exemple dégrader préférentiellement une protéine dans un compartiment donné (Wang and Mandelkow, 2012). Par exemple l'enrichissement de MAP2 dans le compartiment somatodendritique pourrait être le fruit de sa dégradation préférentielle dans l'axone (Zempel and

Mandelkow, 2014). Des questions subsistent toutefois quant aux mécanismes moléculaires permettant le contrôle de la localisation des protéines dans les neurones. Par exemple comment est-ce que le neurone (ou la cellule en général) fait pour identifier les protéines qui doivent être exprimées dans un compartiment donné ? Comment le neurone s'y prend-il pour empêcher l'expression ou l'entrée d'une protéine dans un compartiment qui n'est pas le sien ? Existe-t-il des mécanismes de correction de la répartition subcellulaire des protéines en cas d'altération ?

En somme, le contrôle de la répartition subcellulaire des protéines est une des stratégies, et non des moindres, que les cellules à forte polarité comme les neurones utilisent pour préserver leur protéostasie. L'échec de ce contrôle peut déboucher sur une altération de la distribution des protéines et engendrer une accumulation de la protéine dans un compartiment donné, et ce en dehors de toute anomalie dans la structure de la protéine. Une occurrence potentiellement cytotoxique puisque les protéines ainsi agrégées peuvent non seulement submerger l'ensemble des systèmes de dégradation présents dans le compartiment concerné, mais aussi séquestrer les autres molécules normales et les empêcher d'assurer leurs fonctions.

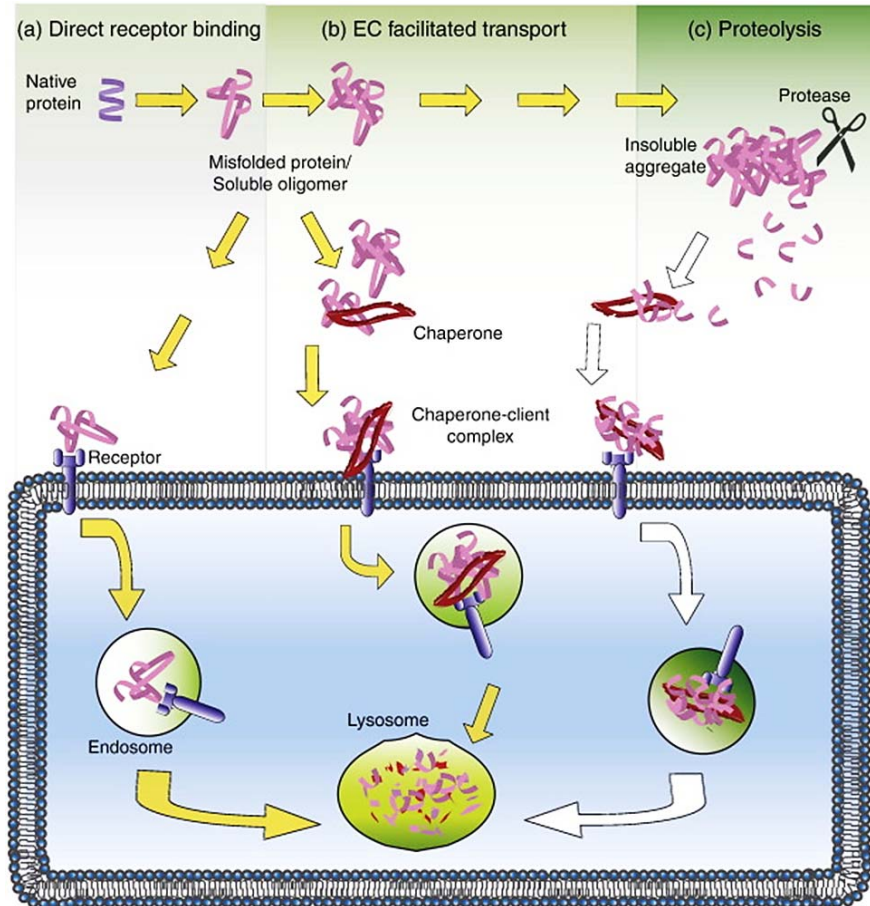
#### **1.2.4. La protéostasie extracellulaire**

La protéostasie ne concerne pas seulement le compartiment intracellulaire. Ceci est d'autant plus vrai pour les cellules baignant en permanence dans une matrice extracellulaire riche en protéine tel que les neurones. Et tout comme dans le cytoplasme, les protéines des différents espaces liquidiens de l'organisme subissent des changements qualitatifs et quantitatifs au fil du temps ceci en raison de l'usure liée à l'activité

tissulaire. Ces changements s'ils ne sont pas rapidement corrigés peuvent produire un amoncellement de protéines dans le milieu extracellulaire.

Les protéines extracellulaires lorsqu'elles sont mal repliées ou agrégées peuvent être directement endocytées. En effet, certaines cellules disposent, à leur surface de récepteurs-éboueurs (*scavenger receptors* en anglais ou SR) lesquelles sont une classe de récepteurs spécialisés dans l'identification et l'internalisation des protéines pathologiques (Figure 10A). Ces récepteurs comprennent le SR-A, SR-BI, et CD36 et se retrouvent notamment chez les cellules endothéliales, immunitaires, et gliales (Husemann et al., 2002).

Par ailleurs, tout comme à l'intérieur de la cellule, il existe dans le milieu extracellulaire des protéines présentant des vertus chaperons ATP-dépendantes et appelées pour cette raison chaperons extracellulaires. Parmi ceux-ci, on dénombre la clusterine, l'haptoglobine, et l' $\alpha$ -2-macroglobuline (Wyatt et al., 2013). Le chaperon extracellulaire le plus caractérisé est la clusterine qui interagit avec la quasi-totalité des protéines extracellulaires mal repliées pour corriger leur conformation, prévenant ainsi la formation d'agrégats. Plus important encore pour la survie cellulaire, la clusterine, l'haptoglobine et l' $\alpha$ -2-macroglobuline peuvent interagir avec les motifs hydrophobes des protéines mal repliées afin de neutraliser leur toxicité. Les chaperons extracellulaires forment également des complexes stables et solubles avec les agrégats de protéines cibles lesquelles se fixent sur les récepteurs éboueurs pour être ensuite endocytés puis dégradés dans les lysosomes (Figure 10B). En ce faisant, les chaperons extracellulaires servent donc d'intermédiaires entre l'altération de la conformation tridimensionnelle des protéines extracellulaire et leur dégradation par les endolysosomes (Yerbury et al., 2016).



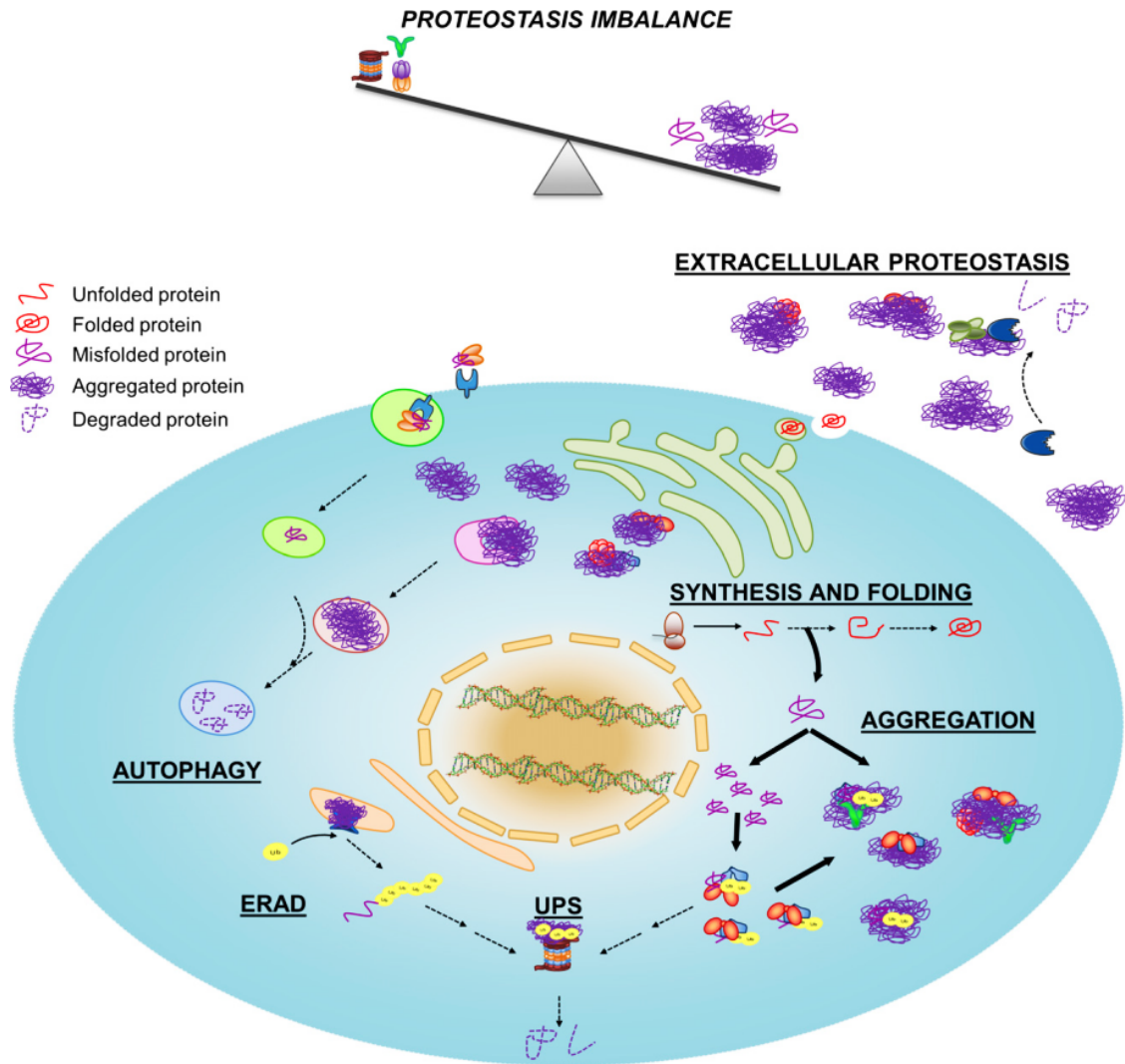
**Figure 10. Voies de contrôle de la protéostasie extracellulaire.** (a) La protéine mal repliée peut se fixer directement à un récepteur-éboueur afin de permettre son internalisation. (b) La liaison des chaperons extracellulaires comme la clustérine, en plus de corriger le repliement des protéines peut aussi favoriser leur endocytose via le récepteur-éboueur. (c) En cas de formation d'agrégats, des protéases extracellulaires peuvent aussi lyser la protéine afin de produire des fragments protéiques plus petits et facilement internalisables par les récepteurs-éboueurs. (a, b, c) Dans les trois cas, les endosomes ainsi formés fusionnent avec le lysosome pour induire la dégradation des protéines. Tiré de Wyatt et al. (2012).

Si d'aventure le processus d'agrégation des protéines extracellulaires parvient à circonvenir le contrôle qu'exercent les chaperons extracellulaires ou les récepteurs-éboueurs, les protéases extracellulaires entrent en jeu pour directement lyser ces agrégats (Wyatt et al., 2012). (Figure 10C). Les protéases extracellulaires sont légions, et

sont subdivisées en 3 grandes familles : les métalloprotéases (neprilysine, métalloprotéases matricielles, enzyme de conversion de l'angiotensinogène), les serines protéases (plasmine, thrombine, tryptase), et les cystéines protéases (cathepsines A, B, D) (Cudic and Fields, 2009).

Le système de la plasmine représente une de ces modalités de protéolyse extracellulaire. Lorsque dans le parenchyme cérébral il se forme des dépôts protéiques, ou des débris cellulaires provenant de lésions tissulaires, ceux-ci activent le tPA (tissue Plasminogen Activator) qui converti le plasminogène en la protéase plasmine. La plasmine pourra à son tour dégrader les dépôts protéiques en leurs unités constitutives débarrassant ainsi le tissu neural d'inclusions potentiellement nocives (Maas et al., 2008; Nolin et al., 2008; Samson et al., 2009). L'agrégation des protéines dans le parenchyme neural lorsqu'elle est importante déclenche également la réponse immunitaire au cours de laquelle les cellules microgliales phagocytent les dépôts protéiques.

Malheureusement, il peut advenir que les différents systèmes protéostatiques que nous venons de passer en revue soient dysfonctionnels, par exemple en raison de l'usure liée au vieillissement, de l'exposition répétitive à des stress cellulaires (traumatismes, radicaux libres, hypoxie), de mutations génétiques, ou de pathologies préexistantes (diabète, hypertension artérielle, infection). Dans ces cas, les protéines mal repliées ou mal distribuées s'accumulent progressivement dans la cellule ou dans le milieu extracellulaire et y forment des amas de protéines qui interfèrent avec le fonctionnement normal de la cellule (Figure 11). Si elles ne sont pas corrigées, ces agrégats protéiques peuvent au fil du temps engendrer des perturbations, voire même causer la mort cellulaire, auquel cas on parlera de protéinopathies.



**Figure 11. Dérégulations de la protéostasie.** En cas de défaillance des acteurs du système de contrôle de la protéostasie nommément les protéines chaperon, le SUP, l'autophagie et la distribution des protéines, des protéines mal repliées s'amassent dans les différents compartiments subcellulaires ou dans le milieu extracellulaire provoquant ainsi la formation d'agrégats de protéines. Ces agrégats vont bloquer les différentes activités de la cellule et causer sa mort. Tiré de Yerbury et al. (2016)



### **1.3. Les protéinopathies**

Dans cette section de la thèse nous allons discuter des protéinopathies en prenant comme modèle deux cas typiques de pathologie protéique : les tauopathies et les  $\beta$ -amyloïdopathies. Disons d'ores et déjà que ces deux affections présentent un point commun : elles affectent principalement les neurones. C'est pourquoi après avoir décrit la physiologie et les dysfonctionnements des protéines concernées, nous terminerons cette section de notre dissertation en évoquant quelques pistes de réflexion sur les raisons qui pourraient expliquer la grande vulnérabilité des neurones aux perturbations de la protéostasie.

#### **1.3.1. Protéine tau et tauopathies**

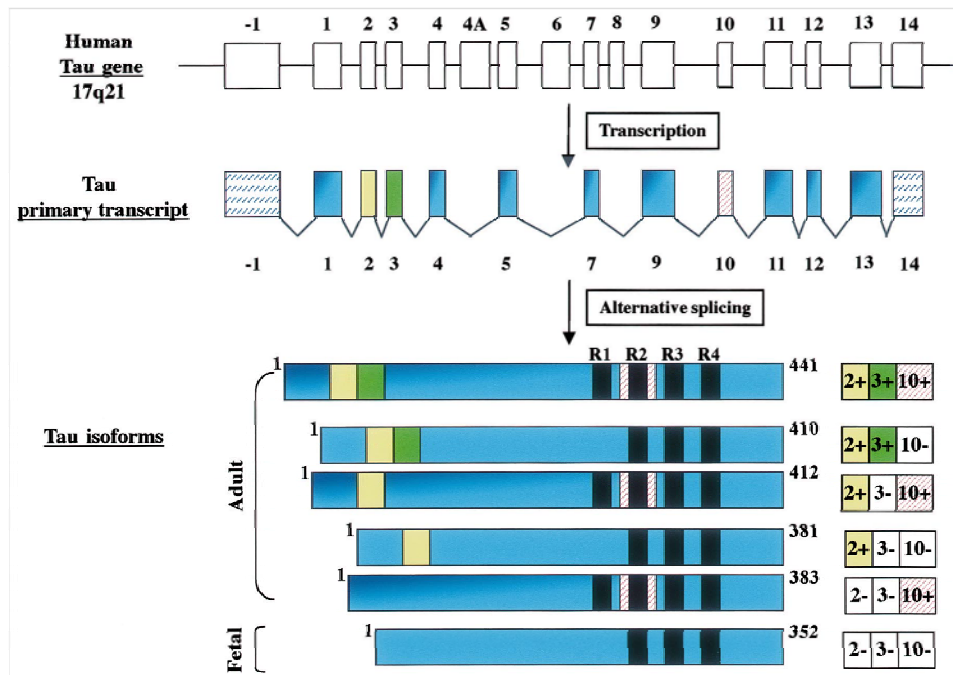
Comme il a été évoqué précédemment, la protéine tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules. Elle est abondamment exprimée dans le système nerveux, bien qu'on en trouve également dans d'autres tissus. Après avoir décrit au préalable la protéine tau et son rôle pour la physiologie cellulaire, nous allons nous attarder sur les dysfonctionnements qui lui sont associés.

##### **1.3.1.1. La protéine tau**

###### **a. Transcription et épissage alternatif de Tau**

Chez l'humain, le gène de la protéine tau est située sur le locus q21 du chromosome 17, et contient 16 exons : les exons -1, 1 à 4, 4a, et 5 à 14 (Andreadis et al., 1992). L'exon -1 fait office de promoteur tandis que dans le SNC les exons 4a, 6 et 8 sont normalement exclus durant la transcription, ce qui fait que le transcrit primaire compte 13

exons. Durant la traduction de l'ARNm, l'exon 14 n'est pas traduit, alors que dans le SNC l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 produit 6 isoformes de la protéine tau variant entre 45 et 65 kDa. Ces isoformes varient par la présence ou non d'un ou deux inserts de 29 acides aminés dans l'extrémité N-terminale codés par les exons 2 et 3 (tau 0N, 1N ou 2N) et par l'ajout d'un motif supplémentaire de 31/32 acides aminés codés par l'exon 10 dans la zone de répétition de l'extrémité C-terminale (tau 3R ou tau 4R) (Goedert et al., 1989; Goedert et al., 1989). L'épissage alternatif de tau est régulé au cours du développement, puisque chez l'humain, seule l'isoforme 3R0N est exprimée dans le cerveau fœtal tandis que toutes les isoformes se retrouvent dans le cerveau adulte (Figure 12) (Kosik et al., 1989).



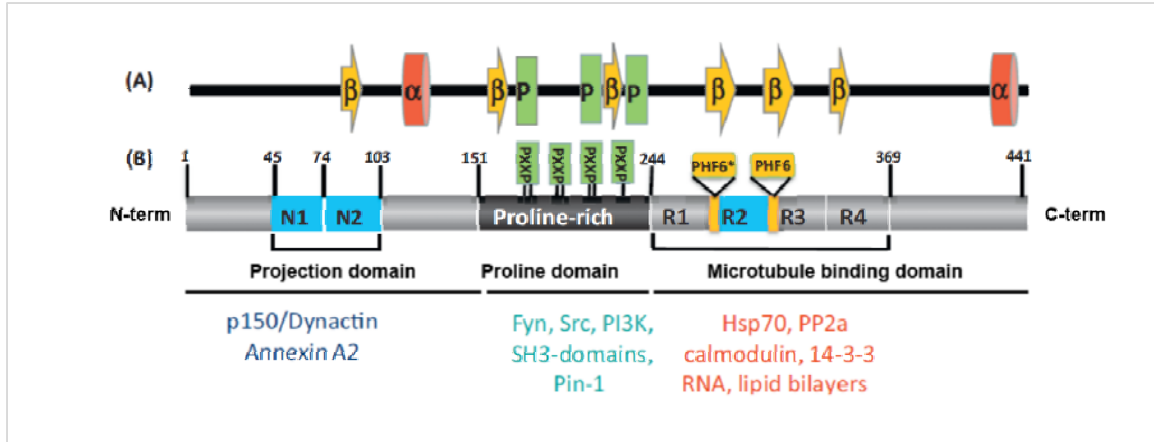
**Figure 12. Épissage alternatif et isoformes de tau.** Chez l'homme, l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 du transcrit primaire de tau produit 6 isoformes de la protéine, contenant respectivement les inserts 2+ (en jaune clair), 3+ (en vert) et 10+ (en rose). Dans le cerveau fœtal, ces 3 exons sont excisés du transcrit primaire afin de produire l'isoforme la plus courte de la protéine dépourvu d'inserts. Chez l'adulte, se retrouve toutes les variantes de la protéine exprimant différentes combinaison des 3 inserts. Tiré de Buee et al. (2000).

Dans le système nerveux périphérique (SNP) et dans certains neurones du SNC, dont les neurones ganglionnaires de la rétine, l'exon 4a qui code pour un insert de 254 acides aminés peut être également inclus dans le transcrit primaire. De la sorte, la traduction de l'ARNm produira cette fois une nouvelle isoforme de 110 kDa de la protéine appelée «big tau » (Goedert et al., 1992; Boyne et al., 1995).

#### **b. Structure biochimique de tau**

Tau est une protéine largement non structurée, qui prend très rarement la conformation tridimensionnelle qu'adoptent habituellement les protéines natives. Indépendamment des isoformes concernées, la protéine tau peut être globalement décrite comme renfermant 3 grands domaines : un domaine d'assemblage à l'extrémité C-terminale, que jouxte une région riche en proline, suivie enfin du domaine de projection à l'extrémité N-terminale (Figure 13) (Zempel and Mandelkow, 2014).

Le domaine d'assemblage C-terminal de nature basique, donc positivement chargé, est responsable de la liaison aux microtubules. Cette région est caractérisée par la présence, selon que l'exon 10 est présent ou pas, de 3 ou 4 motifs de répétitions hautement conservés, sur lesquels se fixeront les microtubules (Goedert et al., 1989; Himmler et al., 1989). Il a été montré que la protéine tau à 4 domaines de répétitions ou tau 4R (contenant les motifs R1, R2, R3, R4) est plus efficace à promouvoir la polymérisation des microtubules que la protéine tau à 3 domaines de répétition ou tau 3R (contenant les motifs R1, R3, R4) (Miyata et al., 1986; Goedert and Jakes, 1990; Lu and Kosik, 2001).



**Figure 13. Structure et partenaires d'interactions de la protéine tau.** (A). Bien que la structure de tau soit linéaire, elle présente néanmoins des régions organisées en hélice- $\alpha$ , feuillet- $\beta$  ou riches en proline. (B) L'illustration de la plus longue isoforme de tau montre que la protéine est divisée en un domaine de projection contenant les inserts N-terminaux (qui interagissent avec la dynactine et l'annexine), un domaine proline riche en motifs PXXP (où se fixent les kinases Src, PI3K, ou Pin1) et un domaine de liaison des microtubules (où s'effectue la liaison de HSP70, PP2A, calmoduline). Modifié de Zempel and Mandelkow (2014).

Le domaine de projection N-terminal contient les inserts codés par les exons 2 et 3, lesquelles en raison de leur caractère hautement acide confèrent une charge négative à cette région de la protéine. Ce domaine de projection permet l'interaction de la protéine avec les protéines du cytoplasme (Carlier et al., 1984; Magnani et al., 2007) et les autres éléments du cytosquelette (Miyata et al., 1986).

Enfin, la région riche en proline électriquement neutre est caractérisée par la présence de jusqu'à 7 motifs PXXP, qui servent de site d'interaction avec le domaine SH3 des tyrosines kinases de la famille Src telle que Fyn (Lee et al., 1998; Zamora-Leon et al., 2001; Ittner et al., 2010). La protéine tau grâce à ses deux extrémités de charges opposées fait office de dipôle électrique, lequel peut être modulé par les modifications post-traductionnelles de la protéine (Buée et al., 2010).

### **c. Fonctions physiologiques de tau et effets modulateurs des modifications post-traductionnelles**

La fonction physiologique de tau la mieux décrite est celle de fixation et de stabilisation des microtubules par le biais de son domaine de liaison aux microtubules (DLMT). La fixation et la stabilisation des microtubules se font grâce aux interactions électrostatiques entre le DLMT positivement chargé et la surface des microtubules négativement chargée (Ballatore et al., 2007). À l'inverse, la séparation de tau des microtubules stimule leur dépolymérisation en leurs unités constitutives à savoir  $\alpha$  et  $\beta$ -tubulines. En stabilisant les microtubules, tau contribue à la préservation du cytosquelette ce qui assure le maintien de la morphologie des neurones. Or nous avons vu que c'est cette morphologie qui confère au neurone sa polarité anatomique et fonctionnelle. De plus, dans la cellule les microtubules font office d'autoroute pour le transport cellulaire, ainsi tau en stabilisant ces derniers permet donc le déplacement du cargo cellulaire entre les différents compartiments neuronaux (Ballatore et al., 2007).

L'effet stabilisateur de tau est régulé par les modifications post-traductionnelles de la protéine dont la plus importante et la mieux étudiée est la phosphorylation. En effet tau est une protéine à fort potentiel de phosphorylation avec plus de 80 sites de phosphorylation putatifs dont la plupart sont situés sur des motifs serine-proline ou thréonine-proline. Ainsi la fixation de tau aux microtubules est accentuée lorsque tau est déphosphorylée mais réduite lorsqu'elle est phosphorylée. Ceci est dû au fait que la phosphorylation de tau en augmentant la charge négative totale de la protéine réduit son interaction électrostatique avec les microtubules (Mukrasch et al., 2007). Il en résulte donc que plus cette phosphorylation sera importante, moins tau pourra fixer les

microtubules. En rapport avec la fonction stabilisatrice des microtubules, les principaux sites de phosphorylation de tau sont les résidus serines et thréonines incluses dans le DLMT ou le jouxtant immédiatement. Il a été montré par exemple que la phosphorylation du résidu serine 262 (S262) situé au cœur même du DLMT réduit grandement l'affinité de tau pour les microtubules (Biernat et al., 1993).

Grâce à ses multiples sites de phosphorylation, tau peut donc contrôler en permanence la dynamique des microtubules en fonction des besoins cellulaires. C'est ainsi que durant le développement lorsque les neurones en croissance ont besoin d'un cytosquelette hautement labile, tau est fortement phosphorylée et stabilise donc peu ou prou les microtubules. Par contre chez l'adulte où il est important pour les neurones d'avoir la stabilité des microtubules requise pour la préservation du cytosquelette, tau est faiblement phosphorylée et reste donc liée aux microtubules (Mawal-Dewan et al., 1994; Rosner et al., 1995).

Le taux de phosphorylation de tau est lui-même régulé par l'action antagoniste des kinases et des phosphatases. Les kinases les plus importantes pour la phosphorylation de tau sont les kinases dirigées vers la proline qui phosphorylent les résidus sérine ou thréonine liés à la proline. Parmi ces kinases se trouvent la MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), la GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthetase Kinase 3-beta), et la Cdk5 (Cyclin dependent kinase 5) (Maccioni et al., 2001; Planel et al., 2002; Zhu et al., 2002). Les principales phosphatases qui agissent sur tau incluent PP1, PP2A et la PP2B (ou calcineurine) (Drewes et al., 1993; Wang et al., 1996). Les analyses *in vivo* montrent que la PP2A est la phosphatase la plus physiologiquement active sur tau (Gong et al., 2000; Planel et al., 2001). De manière intéressante, le groupe de Planel démontre que

l'anesthésie générale en provoquant l'hypothermie diminue considérablement l'activité des phosphatases de tau sans tout en ayant un effet limité sur les kinases, ce qui résulte en l'hyperphosphorylation de la protéine (Planel et al., 2007). Cette étude met bien en évidence le fait qu'en absence d'anomalies génétiques de tau c'est la sommation de l'activité des phosphatases et des kinases qui en fin de compte détermine le profil de phosphorylation de tau et *in fine* son fonctionnement.

Il faut toutefois préciser que d'autres modifications post-traductionnelles sont susceptibles d'influer sur le fonctionnement de tau. La glycosylation de tau est l'une de ces modifications. Elle consiste en l'ajout d'un résidu N-acetylglucosamine sur une serine ou une thréonine de tau afin de former une liaison O-glycosidique. La glycosylation de tau agit de manière inverse à la phosphorylation sur la stabilisation des microtubules (Arnold et al., 1996; Robertson et al., 2004).

Enfin outre son effet sur la polymérisation des microtubules, la protéine tau joue également un rôle important dans la transmission synaptique en permettant notamment le ciblage de Fyn vers la densité post-synaptique, où ce dernier assurera l'activation de la sous unité NR2B des récepteurs NMDA, laquelle activation est requise pour la potentialisation à long terme (PLT) (Ittner et al., 2010).

#### **d. Distribution cellulaire de tau**

Dans les conditions normales, tau est localisée principalement dans les axones, avec une faible expression dans le compartiment somatodendritique. On commence tout juste à appréhender les mécanismes moléculaires à l'origine de cette organisation polaire de tau. Il est exemple connu que dans le neurone adulte, le SIA régule la distribution de

tau. Le SIA agit par son réseau de microtubules qui autorise le passage antérograde de tau du compartiment somatodendritique vers les axones, tout en bloquant le mouvement inverse (Mercken et al., 1995; Li et al., 2011). Kanai et al. montrent que la localisation axonale de tau peut aussi s'expliquer par la plus forte affinité de la protéine pour les microtubules axonaux par rapport à ceux des dendrites (Kanai and Hirokawa, 1995). Cette hétérogénéité dans l'affinité de tau pour les microtubules augmente la quantité de tau libre dans le compartiment somatodendritique, ce qui promeut sa disponibilité pour la dégradation. Des expériences *in vitro* montrent que la distribution cellulaire de tau serait aussi régulée par sa phosphorylation notamment via MARK (Microtubule Affinity Regulating Kinase), une kinase qui reconnaît sélectivement les motifs KXGS (Biernat et al., 2002). Dans les dendrites, MARK en phosphorylant tau diminue sa liaison avec les microtubules ce qui augmente la quantité la protéine de libre (Mandelkow et al., 2004; Li et al., 2011). La protéine tau pourra donc d'être dégradée ou transportée vers les axones, ce qui assure le maintien d'une faible expression de la protéine dans les dendrites.

#### **1.3.1.2. Les tauopathies**

Les tauopathies comme leur nom l'indique font référence à un groupe de maladies neurologiques toutes caractérisées par le dysfonctionnement de la protéine tau. Parmi les tauopathies les plus fréquentes, on peut citer la MA, la maladie de Pick, la paralysie supra-nucléaire progressive, la démence fronto-temporale avec parkinsonisme lié au chromosome 17 (DFTP-17) pour ne citer que celles-ci. Sur le plan neuropathologique, le cerveau de personnes souffrant de ces maladies est caractérisé par la présence d'une importante perte neuronale, une gliose réactive et surtout par la formation dans le cytosol



neuronal d'inclusions protéiques insolubles. Ces dépôts intracellulaires, principales signatures biologiques des tauopathies résultent de l'accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée. Outre l'hyperphosphorylation, l'altération de la conformation et de la distribution de la protéine sont les changements pathologiques usuellement associés aux tauopathies.

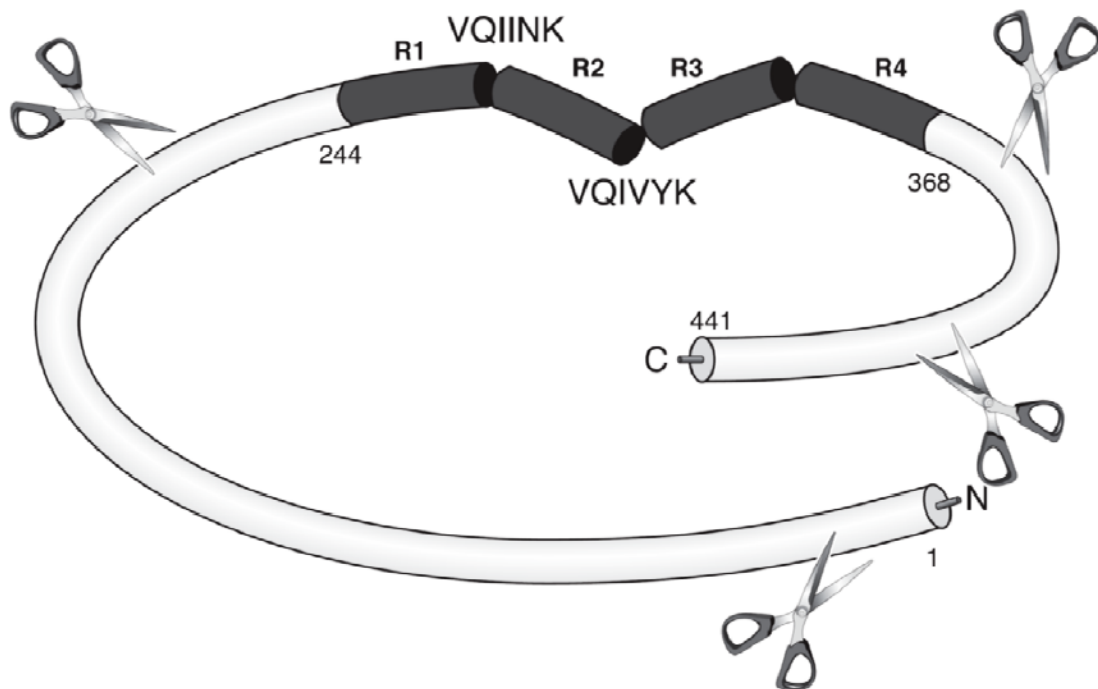
**a. Altérations pathologiques de tau**

*i) Modification du profil de phosphorylation*

La modification post-traductionnelle de tau la plus fréquemment rapportée dans les tauopathies est l'hyperphosphorylation sur de multiples résidus serines et thréonines (Grundke-Iqbal et al., 1986; Morishima-Kawashima et al., 1995). Cette hyperphosphorylation réduit drastiquement l'affinité de tau pour les microtubules (Iqbal et al., 1994) tout en favorisant son agrégation (Alonso et al., 2001). L'hyperphosphorylation de tau peut s'expliquer par une hausse de l'activité des kinases de tau ou une sous-activation de ses phosphatases (Wang et al., 2007). Il est justement montré chez un modèle animal de tauopathie, que l'inhibition de la GSK3- $\beta$  résulte non seulement en une baisse de la phosphorylation de tau, mais aussi à une réduction de la dégénérescence neuronale (Noble et al., 2005). De même, une baisse du niveau de l'ARNm de PP2A (la principale phosphatase de tau), ainsi qu'une forte expression de son enzyme inhibitrice ont été décrites dans les cerveaux alzheimeriens (Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001; Tanimukai et al., 2005).

ii) *Changements de conformation et troncation*

Tau dans sa forme native présente une structure globalement linéaire avec quelques régions organisées en hélice- $\alpha$  et feuillet- $\beta$  (voir figure 13). Cependant dans le cadre des tauopathies, elle subit de multiples changements de conformations qui promeuvent son accumulation dans le cytoplasme. Dans un premier temps, les extrémités C et N-terminales de la protéine se replient sur la région de liaison des microtubules adoptant ainsi une conformation en « épingle à cheveux » (Figure 14) (Jeganathan et al., 2006).



**Figure 14. Changements de conformation de tau.** Le repliement des extrémités C et N-terminales de tau sur la partie centrale de la protéine forme une structure en « épingle à cheveux ». Dans cette conformation, la protéine sera ensuite clivée à ses deux extrémités par différentes caspases (indiqués par les ciseaux) pour produire une forme tronquée de la protéine comprenant la région de liaison aux microtubules ; ce fragment de tau présente une forte propension à l'agrégation. Tiré de De Strooper (2010)

Le repliement de la protéine tau est ensuite suivi d'un clivage de la partie C-terminale de la protéine successivement sur les résidus Asp421 et Glu391. Bien qu'on ignore la protéase responsable de la troncation sur Glu391, on sait par contre que *in vitro* et *in vivo*, la caspase-3 est capable d'effectuer la troncation de tau sur Asp421 (Fasulo et al., 2000; Gamblin et al., 2003; Rissman et al., 2004). Tau peut également subir une troncation vers son extrémité N-terminale, plus précisément au niveau de l'Asp13, et il est montré *in vitro*, que ce clivage est catalysée par la caspase-6 (Horowitz et al., 2004).

### *iii) Altération de la distribution cellulaire*

Parmi les signes pathognomoniques des tauopathies, on retrouve la délocalisation de tau du compartiment axonal vers le compartiment somatodendritique. Cette altération de la polarité de tau témoigne de l'existence d'anomalies dans les mécanismes de contrôle de sa distribution neuronale.

### **b. Mécanismes d'agrégation de tau**

Les modifications pathologiques de tau décrites précédemment promeuvent l'accumulation de tau dans le soma et les dendrites sous forme d'agrégats insolubles. Ces agrégats au fil du temps s'organisent pour former successivement les filaments du neuropile et des enchevêtrements neurofibrillaires. L'agrégation de tau est l'aboutissement d'un processus multiséquentiel qu'initie la baisse de son interaction avec les microtubules. Cependant, les événements déclencheurs de ce processus restent encore à élucider. Un des mécanismes proposés pour expliquer l'accumulation de tau est celui l'hyperphosphorylation. Comme évoqué tantôt la hausse de la phosphorylation de la

protéine augmente sa charge négative ce qui réduit son interaction avec les microtubules, résultant en une hausse drastique de la concentration cytosolique de tau libre. De surcroît, la phosphorylation de tau facilite son interaction avec les formes non phosphorylées de la protéine (Alonso et al., 1996), probablement par le biais d'interactions électrostatiques. Ceci a pour effet d'accroître d'avantage la quantité de la protéine piégée dans le cytosol.

Les molécules de tau devenues libres vont s'associer pour former des dimères, puis des oligomères solubles. Ces derniers serviront de noyau central autour desquels vont s'agglomérer d'autres molécules, un processus nommé nucléation. Au fil des années la répétition des étapes, séparation des microtubules, oligomérisation, et nucléation va dans un premier temps aboutir à la formation d'agrégats amorphes de tau ; à cette étape, les dépôts sont désignés comme étant des pré-enchevêtrements. L'accumulation de tau lorsqu'elle continue, débouche plus tard sur la formation de dépôts insolubles, organisés en paires de filaments hélicoïdaux, positives à la thioflavine T et au rouge Congo (preuve du réarrangement des protéines en feuillets- $\beta$ ). Ces filaments hélicoïdaux sont les éléments constitutifs des enchevêtrements neurofibrillaires (Kuret et al., 2005; Ballatore et al., 2007).

Le modèle d'agrégation de tau comme étant une conséquence de son hyperphosphorylation bien qu'attrayant n'explique pas cependant toutes les observations expérimentales. Par exemple, il a été montré *in vitro* qu'au pH physiologique et dans des conditions de grande force ionique, tau même lorsqu'elle est déphosphorylée est capable de s'assembler en filaments hélicoïdaux (Goedert et al., 1996). De plus, la phosphorylation sur Ser262 (et Ser214 dans une moindre mesure) bien qu'elle diminue l'affinité de tau pour les microtubules inhibe plutôt la formation d'enchevêtrements

neurofibrillaires (Schneider et al., 1999). C'est pourquoi d'autres explications à l'agrégation de tau ont été proposées, notamment le changement de conformation et le clivage de la protéine.

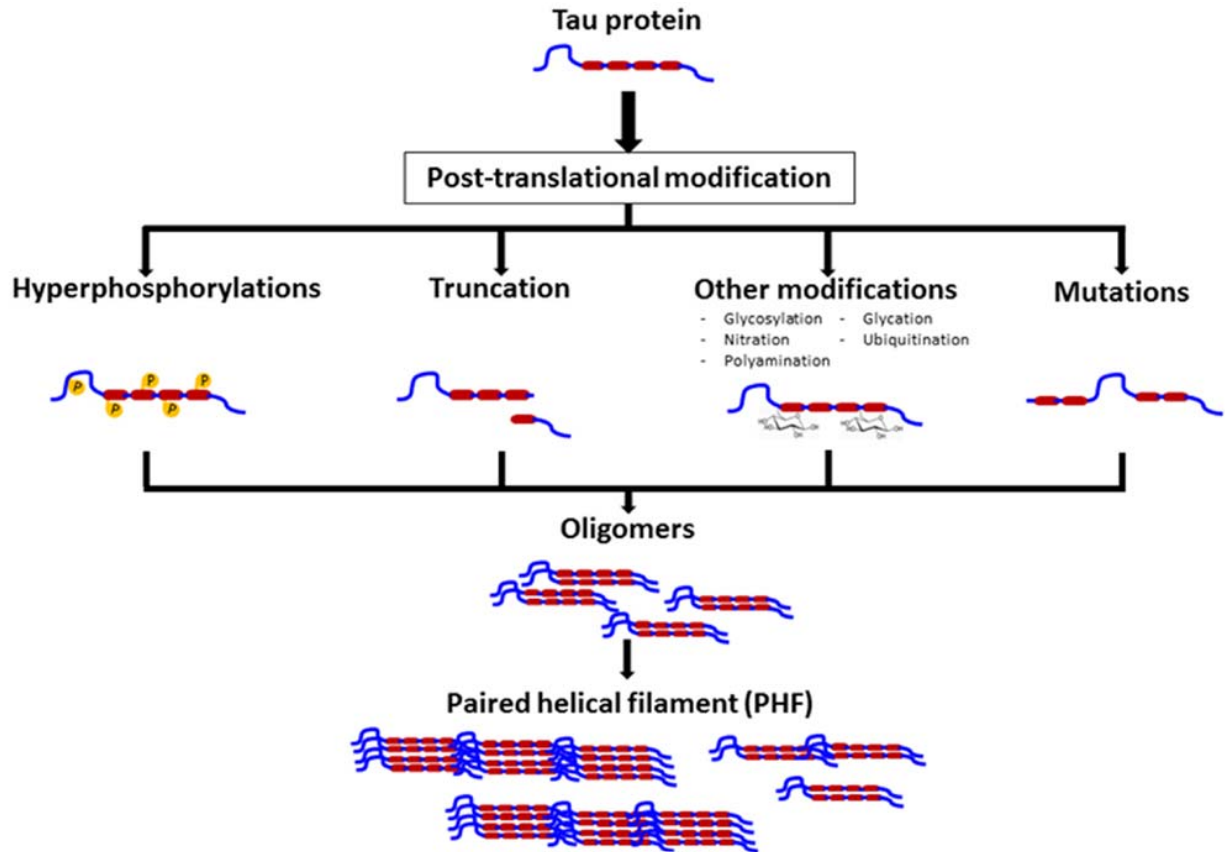
Des études ont montré que l'expression dans des neurones d'une forme clivée de la protéine tau, ne contenant que le DLMT et donc dépourvu de la majeure partie des sites de phosphorylation, provoque l'accumulation de tau dans le cytoplasme y compris la forme non clivée (Wang et al., 2007). De plus, cette forme tronquée de tau est suffisante pour former des enchevêtrements neurofibrillaires et causer la neurodégénérescence *in vivo* (Zilka et al., 2006). De manière intéressante, la propension du DLMT à l'agrégation est due à la présence de part et d'autre de la région R2 (codée par l'exon 10) de deux motifs hexapeptides. Ces deux motifs, qui prennent préférentiellement la conformation en feuillet- $\beta$ , ont une forte tendance à provoquer l'autoassemblage de la protéine (von Bergen et al., 2000). En outre, il a été montré que les extrémités N- et C-terminales de la protéine inhibent l'agrégation de tau (Abraha et al., 2000; Horowitz et al., 2004). En d'autres termes, l'exposition du DLMT suite au clivage des extrémités de tau (tel qu'illustré dans la Figure 14) promeut la formation d'agrégats.

D'autres modifications post-traductionnelles de tau sont également capables de causer des changements de conformation de la protéine et de provoquer son agrégation parmi lesquelles l'acétylation, la glycosylation, la glycation, et la nitration (Fontaine et al., 2015). L'acétylation de tau sur les résidus lysine est particulièrement important sur le point de vue pathologique. Il est en effet prouvé que dans le cerveau de sujets atteints de tauopathie, l'acétylation de tau notamment sur les résidus Lys174 et Lys280 inhibe son fonctionnement et promeut la formation d'agrégats (Min et al., 2010; Cohen et al., 2011).

L'agrégation est notamment due à l'effet inhibiteur de l'acétylation sur l'ubiquitination de tau, ce qui prévient la dégradation de la protéine (Min et al., 2010).

Des mutations dans le gène codant pour tau peuvent provoquer de profonds changements dans la protéine résultant en son agrégation à plus ou moins long terme. Les mutations de tau les plus fréquentes sont celles associées à la DFTP-17, une tauopathie autosomale dominante caractérisée par l'atrophie du lobe frontal et du lobe temporal. Un nombre important de ces mutations sont des mutations faux-sens et de délétion survenant dans les régions codantes du gène. Parmi celles-ci on peut citer les mutations P301L, P301S, S305N,  $\Delta$ K280 qui surviennent toutes dans l'exon 10 (Brandt et al., 2005). Ces mutations ont pour effet de réduire l'affinité de tau pour les microtubules et de favoriser son accumulation dans le cytosol. Des mutations dans les régions non codantes du gène de tau peuvent aussi avoir lieu, notamment dans l'intron suivant immédiatement l'exon 10. De telles mutations influent positivement sur l'insertion de l'exon 10 dans le transcrit final favorisant la formation de tau 4R - contenant l'insert R2 - au détriment de tau 3R. Or nous avons vu précédemment que l'insert R2 est flanqué de motifs hexapeptides qui promeuvent l'auto-assemblage de la protéine. De la sorte, la hausse de l'expression de tau4R favorise son agrégation (Brandt et al., 2005). Parallèlement, les mutations associées au DFTP-17 promeuvent l'hyperphosphorylation de tau, laquelle en diminuant la liaison de la protéine avec les microtubules augmente la quantité de protéine libre dans la cellule, ce qui renforce son agrégation.

En somme, des modifications structurelles de tau qu'elles soient dues à des changements pré ou post-traductionnelles conduisent à l'oligomérisation et ultimement à l'agrégation de la protéine. (Figure 15).



**Figure 15. Processus d'agrégation de tau.** Les modifications post-traductionnelles (hyperphosphorylation, troncation, glycosylation, ubiquitination) et les mutations de tau favorisent l'accumulation et l'oligomérisation de tau. Ces oligomères lorsqu'ils augmentent s'organisent par la suite en filaments hélicoïdaux, qui plus tard formeront les enchevêtrements neurofibrillaires. Tiré de Guzman-Martinez et al. (2013).

### c. Troubles de la protéostasie et accumulation de tau

Indépendamment de ses propres modifications, la formation d'inclusions de tau observée dans les tauopathies est également indicatrice d'une faillite de la protéostasie. Cette faillite est la résultante de dysfonctionnements des différents mécanismes de contrôle de la conformation, de la localisation et de la distribution de tau.

*i) Les protéines chaperonnes*

L'une des premières études établissant le lien entre protéines chaperonnes et tauopathies fut celle de Dou et al. qui révéla que dans l'hippocampe de patients atteints de la MA et dans celui de souris exprimant la mutation DFTP-17, les niveaux de HSP70 et de HSP90 sont chacun inversement corrélé à l'accumulation de tau. Mais plus important, les auteurs de l'étude démontrèrent que HSP70 et HSP90 agissent directement sur tau afin d'assurer son maintien dans sa conformation soluble, tout en promouvant son interaction avec les microtubules, ce qui prévient l'agglomération de la protéine (Dou et al., 2003). Ces résultats furent corroborés par des analyses ultérieures qui rapportèrent que HSP70 inhibe l'agrégation en assurant la fixation des monomères et oligomères de tau. Ceci résulte en un blocage des processus de nucléation et de fibrillation (Patterson et al., 2011; Voss et al., 2012). Ces études suggèrent donc que dans les tauopathies, la baisse de l'activité des protéines chaperonnes contribuerait à l'accumulation de tau.

*ii) Le SUP et le contrôle de la dégradation de tau*

L'ubiquitination de tau est une des modifications post-traductionnelle couramment observées dans les tauopathies (Cripps et al., 2006), et elle s'effectue principalement dans les agrégats (Morishima-Kawashima et al., 1993). Étant donné que l'ubiquitination d'une protéine sert de signal de dégradation par le protéasome, la persistance de tau polyubiquitinée dans les agrégats est révélatrice d'une altération du système du SUP. Effectivement, des analyses post-mortem de cerveau de patients montrent une baisse de l'activité du protéasome, y compris dans les terminaux synaptiques, et ce malgré un niveau d'expression normal (Keck et al., 2003; Tai et al.,



2012). Il a ensuite été montré *in vitro* et *in vivo* que la baisse de l'activité du protéasome 26S n'est pas spécifiquement due à un effet inhibiteur de tau, mais plutôt à l'accumulation de la protéine qui exerce un effet de saturation sur le protéasome (Keck et al., 2003; Myeku et al., 2016).

Le dysfonctionnement du SUP peut aussi être la conséquence d'anomalies des enzymes en charge de l'ubiquitination. Il est par exemple montré que la co-transfection de tau et de GSK3 $\beta$  dans des cellules non neuronales, conduit à la formation d'agrégats toxiques de tau hyperphosphorylée. Mais lorsque dans ces cellules on rajoute l'ubiquitine ligase CHIP et l'ubiquitine, il se produit une polyubiquitination de tau hyperphosphorylée suivie d'une hausse de la survie des cellules (Shimura et al., 2004). Cette étude démontre que dans les conditions normales, CHIP prévient la formation d'agrégats en ubiquitinant tau hyperphosphorylée afin de permettre sa lyse. Ceci suggère donc que la hausse de tau lors des tauopathies résulterait d'une baisse de l'activité de CHIP. Ainsi, l'augmentation anormale du niveau cérébral de CHIP observée chez les patients (Petrucci et al., 2004), serait un effort infructueux des neurones de compenser la baisse de l'activité de l'ubiquitine ligase. Par ailleurs, la présence d'une forme mutante de l'ubiquitine a été décrite dans le cerveau de sujets atteints de la MA. *In vitro* cette ubiquitine mutante est un puissant inhibiteur du protéasome, suggérant ainsi que son expression dans les tauopathies favorise l'accumulation de tau (Lam et al., 2000). Finalement, les modifications post-traductionnelles de tau peuvent influencer sur sa propre protéostasie. C'est ainsi que la phosphorylation ou l'acétylation en plus de favoriser l'accumulation de tau inhibent également sa dégradation par le protéasome (Dickey et al., 2007; Min et al., 2010).

### *iii) Troubles de l'autophagie*

L'abondance dans le cytoplasme neuronal d'inclusions de tau témoigne d'un échec patent de l'autophagie. Il existe effectivement une abondante littérature scientifique faisant état d'anomalies de l'autophagie dans des contextes de tauopathie (Hamano et al., 2008; Rodríguez-Navarro et al., 2010; Schaeffer et al., 2012; Lee et al., 2013). Il est intéressant de noter qu'en rapport avec le cas particulier de l'agrèphagie c'est-à-dire de l'autophagie orientée vers les agrégats, il a été démontré que tau est un puissant inhibiteur de l'histone deacetylase 6 (HDAC 6) (Ding et al., 2008; Perez et al., 2009; Guthrie and Kraemer, 2011). Or l'HDAC 6 est un important régulateur de l'agrèphagie puisqu'il est fait office d'intermédiaire entre la dynéine et les microtubules lors du transport rétrograde des agrésomes ubiquitinés vers le centre organisateur des microtubules (Kawaguchi et al., 2003). Ces résultats suggèrent donc que l'accumulation de tau dans le cytosol en inhibant fortement l'activité des HDAC6 réduit considérablement l'agrèphagie. De plus l'inactivation de HDAC6 par tau se fait par le biais du DLMT; ceci signifie que le clivage C et N-terminal de tau tel qu'observé dans les PFH, en libérant le fragment contenant le DLMT, aggrave l'inhibition de l'agrèphagie (Ding et al., 2008).

### *iv) Altération de la répartition cellulaire de tau*

La redistribution de tau dans le soma et les dendrites au détriment des axones participe également au déséquilibre protéostatique de tau. Bien que les causes de l'inversion de la polarité de tau encore à élucider, plusieurs mécanismes plausibles peuvent être pris en considération. On peut mentionner par exemple le dysfonctionnement du mécanisme de triage de tau, tâche normalement dévolue au SIA.

La redistribution de tau pourrait aussi s'expliquer par une baisse de la protéolyse de tau dans le compartiment somatodendritique, ou inversement par une hausse de sa dégradation dans l'axone. Enfin, la diminution du transport antérograde de tau du soma vers l'axone ou la hausse de son transport rétrograde dans le sens inverse peuvent également rendre compte de l'accumulation de la protéine dans le pôle somatodendritique au détriment des axones (Kanaan et al., 2012; Zempel and Mandelkow, 2014).

En définitive, il apparaît donc que l'accumulation de tau dans les neurones est la résultante de multiples facteurs incluant les modifications post -traductionnelles, les mutations géniques, altération de la distribution, et la baisse de la dégradation, qui agissent de concert pour augmenter sa concentration intracellulaire favorisant ainsi la formation d'agrégats insolubles à caractère toxique.

#### **d. Mécanismes de toxicité de tau**

Pour des raisons évidemment liées à son effet stabilisateur des microtubules, le premier mécanisme permettant d'expliquer la neurotoxicité de tau concerne le dysfonctionnement des microtubules suivant le modèle de perte de fonction toxique. Ainsi, la séparation de tau des microtubules suite à son hyperphosphorylation engendre la déstabilisation des microtubules qui se dépolymérisent. Ceci crée des effets dévastateurs sur les neurones dont on sait qu'ils dépendent des microtubules pour le maintien de leur polarité et pour le transport cellulaire. Parallèlement, la formation de dépôts insolubles de tau séquestre les protéines fonctionnelles du cytosol, compliquant d'avantage la situation neurone.

Étant donné la forte corrélation entre le niveau d'accumulation de tau et les déficits cognitifs observés dans les tauopathies (Braak and Braak, 1991; Arriagada et al., 1992), on n'a longtemps pensé que les inclusions tau-positives présents en abondance dans le cerveau des malades constituaient les formes toxiques de la protéine. Cependant, plusieurs données expérimentales sont venues remettre cette assertion en question. Primo, la suppression de tau dans un modèle inducible de tauopathie exprimant la mutation tau P301L produit des améliorations des symptômes cognitifs, nonobstant la persistance des enchevêtrements neurofibrillaires qui continuent de s'accumuler (Santacruz et al., 2005). Secundo, dans un autre modèle de tauopathie exprimant cette fois la mutation tau P301S, il a été observé que la perte synaptique et la microglie réactive précèdent la formation des enchevêtrements neurofibrillaires (Yoshiyama et al., 2007). Ceci signifie que d'autres espèces de tau seraient responsables de la toxicité cellulaire. Des études ultérieures ont par la suite montré que les oligomères de tau, des intermédiaires dans le processus d'agrégation, sont l'une des espèces responsables de la toxicité de la protéine. En effet, contrairement aux monomères et aux fibrilles de tau, l'injection d'oligomères de tau dans l'hippocampe de souris saines provoque la baisse de la PLT et la mort des neurones, le tout couronné par des troubles mnésiques (Lasagna-Reeves et al., 2011; Fá et al., 2016). On pourra remarquer au passage que les oligomères de tau exercent des effets synaptotoxiques sur les neurones. Ceci illustre un nouveau mécanisme de toxicité de tau indépendant des microtubules cette fois causé par un gain de fonction toxique de tau au niveau des dendrites. En rapport avec la transmission synaptique, un mécanisme potentiel de toxicité de tau qui suscite de vifs intérêts est celui impliquant la kinase Fyn, un activateur de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Abe et

al., 2005). On a vu tantôt que Fyn est un partenaire d'interaction de tau qui assure son ciblage vers la densité-post synaptique des épines dendritiques (Ittner et al., 2010). Ainsi l'accumulation de tau dans les dendrites en réponse à la redistribution somatodendritique de la protéine causerait une hyperactivation des récepteurs NMDA par Fyn déclenchant ainsi la mort des neurones par excitotoxicité.

On remarquera qu'exception faites des oligomères de tau, les processus neurotoxiques associés aux tauopathies se déroulent essentiellement dans le milieu intracellulaire. En cela les tauopathies diffèrent des  $\beta$ -amyloïdopathies, qui exercent leurs effets pathologiques à partir du milieu extracellulaire. Nous allons maintenant nous intéresser aux  $\beta$ -amyloïdopathies et à leur acteur principal, l'amyloïde bêta ( $A\beta$ ).

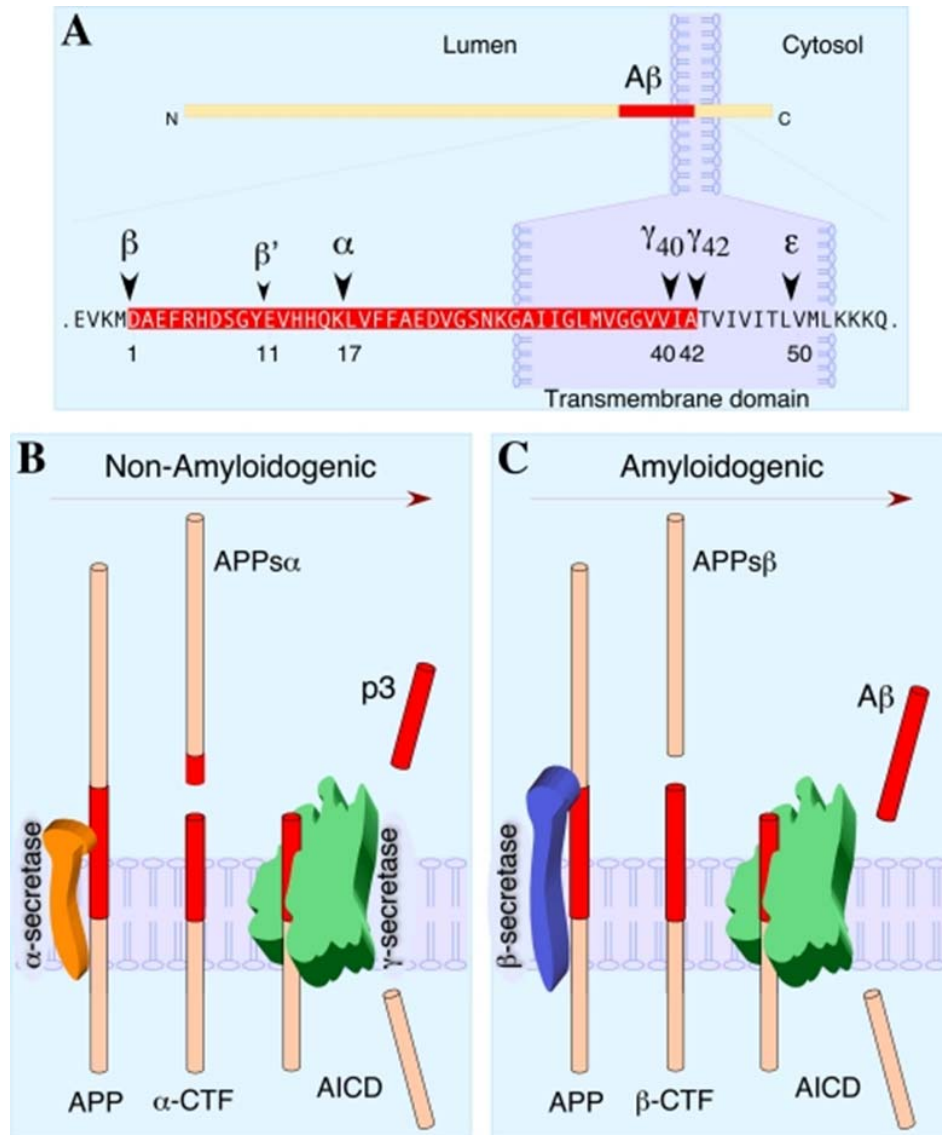
### **1.3.2. Amyloïde bêta et $\beta$ -amyloïdopathies**

Rudolph Virchow, père de la pathologie moderne, introduisit le terme amyloïde en 1854 pour décrire les anomalies macroscopiques qu'il observait dans le cerveau après le test de coloration à l'iode. Il choisit le terme amyloïde, dérivé du latin amyllum qui signifie amidon parce qu'il croyait, et à tort, que ces anomalies en raison de leur réaction positive à l'iode étaient constituées d'amidon (Sipe and Cohen, 2000). Il fut ultérieurement prouvé que ces dépôts amyloïdes sont en réalité constitués par la formation d'amas de protéines anormalement repliées. Qu'à cela ne tienne, le terme amyloïde a subsisté et fait désormais référence à des dépôts protéiques qui se distinguent par la présence de feuilletts  $-\beta$ , la biréfringence lorsqu'observée en lumière polarisée après coloration au rouge Congo, et une ultrastructure fibrillaire. Chez l'humain la présence localisée ou systémique de structures amyloïdes a été décrite dans plusieurs pathologies

dont la MA, les insulinomes, les myélomes, et les cardiopathies (Westermarck et al., 2007). Plus spécifiquement, chez les sujets atteints de la MA on observe dans le cerveau la formation de plaques séniles constituées de dépôt extracellulaire d'A $\beta$ . La formation de ces dépôts dans le cerveau découle d'anomalies dans la production et la clairance de l'A $\beta$ , avec comme corollaire une dégénérescence neuronale : c'est ce qu'on appelle une  $\beta$ -amyloïdopathie. Avant de nous attarder sur les  $\beta$ -amyloïdopathies et leurs conséquences, nous allons tout d'abord décrire la synthèse de l'A $\beta$  à partir de son précurseur APP (Amyloid- $\beta$  Precursor Protein).

#### **1.3.2.1. L'APP et ses voies de protéolyse**

L'APP est une protéine transmembranaire de type I dont le gène est situé sur le locus q21 du 21<sup>ème</sup> chromosome (Robakis et al., 1987; Patterson et al., 1988; Wirak et al., 1991). L'APP présente toutes les caractéristiques d'un récepteur membranaire avec un ectodomaine extracellulaire, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire; toutefois son ligand demeure toujours inconnu. L'épissage alternatif de l'ARNm de l'APP produit trois principales isoformes : APP695, APP751, et APP 770, désignés ainsi en fonction de leur nombre d'acides aminés respectifs. Bien qu'APP soit exprimé à travers tout l'organisme, c'est l'isoforme la plus courte, c'est à dire APP695 qui se retrouve principalement chez les neurones (Zheng and Koo, 2006). L'APP est le substrat de diverses sécrétases qui agissent sur différents résidus de la protéine pour générer de multiples fragments peptidiques (Figure 16A). L'action de ces protéases se fait au travers de 2 voies de clivage de l'APP dénommées respectivement voie amyloïdogénique et voie non amyloïdogénique selon qu'elles produisent l'A $\beta$  ou pas.



**Figure 16. APP et ses voies de clivage.** (A) L'APP est une protéine à 1 domaine transmembranaire substrat des  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ -sécrétases (sites de clivages indiqués par les pointes de flèches). (B) Dans la voie de clivage non amyloïdogénique, l' $\alpha$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase clivent respectivement l'APP pour libérer les fragments p3 et AICD. Le substrat de l' $\alpha$ -sécrétase est à l'intérieur du domaine A $\beta$  ce qui prévient la formation de ce dernier. (C) Dans la voie de clivage amyloïdogénique l'action séquentielle de la  $\beta$ -sécrétase et de la  $\gamma$ -sécrétase produit le peptide A $\beta$  et le fragment AICD. Tiré de Thinakaran and Koo (2008).

**a. Clivage non amyloïdogénique de l'APP**

Dans la voie non amyloïdogénique, une  $\alpha$ -sécrétase clive l'APP entre les résidus Lys16 et Leu17 c'est-à-dire au sein de la région correspondant à l'A $\beta$ . Ceci libère l'ectodomaine de la protéine ou APPs $\alpha$  à caractère soluble. Le fragment C-terminal restant (APP-CTF $\alpha$ ), toujours lié à la membrane, est ensuite clivé par une  $\gamma$ -sécrétase entre les résidus Val40 et Ile41 ou entre Ala42 et Thr43 pour produire le fragment p3<sub>17-40</sub> ou p3<sub>17-42</sub> (Thinakaran and Koo, 2008). Il restera ensuite le fragment intracellulaire ou AICD (APP intracellular domain), libéré dans le milieu intracellulaire (Figure 16 B).

Parmi les protéases dotées d'une activité  $\alpha$ -sécrétase se trouvent les protéines transmembranaires de la famille ADAM (A disintegrin metalloprotease), dont ADAM 9, ADAM 10 et ADAM 17 (Sisodia, 1992; Fahrenholz et al., 2000; Asai et al., 2003; Tanabe et al., 2007). La  $\gamma$ -sécrétase pour sa part est un complexe multiprotéique constitué par la combinaison de 4 sous-unités : la préséniline (PS), la nicastrine, l'APH-1 (anterior pharynx-defective 1) et Pen 2 (presenilin enhancer 2). La PS (dont il existe deux isoformes PS1 et PS2) est une protéine à 9 domaines transmembranaires, dotée d'une activité aspartyl protéase, faisant de cette dernière le site actif du complexe  $\gamma$ -sécrétase. Néanmoins, l'activité de la PS1 nécessite le recrutement au préalable des 3 autres protéines membres du complexe, requises pour stabiliser la PS et assurer son interaction avec le substrat (Chow et al., 2010). Dans le contexte neuronal, la voie non amyloïdogénique est considérée comme neuroprotectrice dans la mesure où elle empêche la formation d'A $\beta$  potentiellement toxique.



## **b. Clivage amyloïdogénique de l'APP**

Le clivage amyloïdogénique de l'APP est amorcé par une  $\beta$ -sécrétase ou BACE ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme) qui tronque la partie extracellulaire de la protéine au niveau du résidu Asp1 du futur A $\beta$  afin de libérer l'ectodomaine soluble ou APPs $\beta$ . Le fragment C-terminal (APP-CTF $\beta$ ) qui en résulte est subséquentement clivé par la  $\gamma$ -sécrétase au niveau des résidus Val40 ou Ala42 afin de produire respectivement l'A $\beta$ <sub>40</sub> ou l'A $\beta$ <sub>42</sub>. La  $\gamma$ -sécrétase en ce faisant libère également le segment AICD dans le cytoplasme (Figure 16C).

BACE-1 et son homologue BACE-2 sont des protéines à un domaine transmembranaire, membres de la famille des protéases aspartiques homologue de la pepsine (à l'instar de la rénine, et de la cathepsine). L'expression de BACE-1, la  $\beta$ -sécrétase la plus abondante et la plus importante pour la production de l'A $\beta$  présente une régulation complexe. L'hypoxie et divers stress cellulaires peuvent activer Cdk5/p25 qui en agissant via le facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) augmente l'expression de BACE-1 (Wen et al., 2008). De même, l'hypoxie stimule l'expression de BACE-1 par le biais du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$ ) qui se fixe sur l'élément de réponse à l'hypoxie inclus dans le promoteur du gène BACE-1 afin d'activer sa transcription (Zhang et al., 2007).

### **1.3.2.2. Rôles physiologiques de l'APP et de ses métabolites**

*i) APP* : Il joue un important rôle trophique en assurant entre autres l'extension des neurites et en favorisant la synaptogenèse comme le montre la hausse de son expression

durant la phase de maturation des neurones (Hung et al., 1992; Perez et al., 1997). Les souris dépourvues d'APP présentent des troubles du développement incluant l'atrophie cérébrale, les troubles de l'apprentissage, la réduction de l'amplitude des PLT. (Ring et al., 2007).

*ii) APPs $\alpha$*  : Des études *in vivo* démontrent qu'il est impliqué dans la transmission synaptique dans la mesure où il stimule la fonction des récepteurs NMDA et prolonge la PLT ce qui se solde par une amélioration de la mémoire spatiale et de l'apprentissage en général (Meziane et al., 1998; Taylor et al., 2008). APPs $\alpha$  promeut également la différenciation des neurones en stimulant la formation et l'extension des neurites via l'activation dépendante de la voie MAPK (Gakhar-Koppole et al., 2008)

*iii) APPs $\beta$*  : Son rôle le mieux connu est celui d'élagage des synapses durant le développement du SNC et du SNP. Cette action se fait par le biais du récepteur de la mort DR6 (Death Receptor 6) qui après liaison de l'APPs $\beta$ , active la caspase 6 qui ira détruire la terminaison présynaptique, tout en préservant le soma. On peut donc en déduire que la surproduction de l'APPs $\beta$  dans le cadre d'une voie amyloïdogénique hyperactive pourrait provoquer une activation prolongée du récepteur DR6, provoquant ainsi la dégénérescence axonale.

*iv) p3* : Aucun rôle physiologique ou pathologique n'a encore été établi pour ce fragment issu du clivage non amyloïdogénique d'APP.

v)  $A\beta$  : Bien que son rôle physiologique soit longtemps resté mystérieux, des études récentes militent fortement en faveur d'un rôle primordial de l' $A\beta$  dans la survie neuronale. Un argument en faveur de cela est le fait que la suppression de l' $A\beta$  (par exposition à des inhibiteurs de BACE-1, de  $\gamma$ -sécrétase ou par immunodéletion) cause la mort neuronale, un effet pouvant être abrogé par ajout de quantités physiologiques d' $A\beta$  (Plant et al., 2003). D'autres travaux suggèrent que le rôle physiologique de l' $A\beta$  serait de réguler la transmission synaptique. Kamenetz et al., en travaillant sur des tranches d'hippocampe, ont découvert par exemple que la hausse de l'activité des récepteurs NMDA, augmente la production de l' $A\beta$  qui en retour réprime la transmission synaptique. Ce rétrocontrôle négatif de l' $A\beta$  sur l'activité synaptique protège donc les neurones contre l'excitotoxicité découlant de l'hyperexcitation (Kamenetz et al., 2003). Ces résultats furent corroborés par les travaux de Lesne et al., qui ont établi que la stimulation sublétales des récepteurs NMDA inhibe l'activité  $\alpha$ -sécrétase ce qui promeut la formation de l' $A\beta$  (Lesne et al., 2005).

vi) *AICD* : Des analyses *in vitro* montrent que le fragment intracellulaire libéré après le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase est dirigé vers le cytosol. A ce niveau l'*AICD* se lie à la protéine adaptatrice Fe65 puis recrute l'histone deacytelase TIP60. Il s'ensuit la translocation du complexe vers le noyau afin d'assurer l'activation de gènes cibles tels que p53, GSK3 $\beta$ , neprilysine, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Muller et al., 2008; Slomnicki and Lesniak, 2008; Ceglia et al., 2015). Certains de ces gènes cibles tels que la neprilysine une  $A\beta$  protéase, (Iwata et al., 2001) et WAVE1 un inhibiteur de l'insertion membranaire d'APP (Ceglia et al., 2015) agissent en réduisant la production

de l'A $\beta$ . Il semble donc qu'AICD exerce un rétrocontrôle négatif sur la production d'A $\beta$ . En revanche, la translocation nucléaire du tandem AICD-Fe65 et l'activation de la transcription des gènes cibles par ces derniers n'ont pu être reproduites *in vitro* par d'autres chercheurs (Waldron et al., 2008), ce qui soulève une vive controverse quant au rôle de l'AICD comme facteur de transcription. Dans tous les cas, ces supputations découlent toutes d'expériences effectuées *in vitro* raison pour laquelle l'existence (ou l'inexistence) d'un rôle physiologique d'AICD reste à prouver *in vivo*.

### **1.3.2.3. Les $\beta$ -Amyloïdopathies**

Les  $\beta$ -amyloïdopathies représentent une famille de protéinopathies caractérisées par le dysfonctionnement de l'A $\beta$ . Bien que la MA soit de loin la  $\beta$ -amyloïdopathie la plus fréquente et la mieux étudiée, et il existe cependant d'autres  $\beta$ -amyloïdopathies telles que l'angiopathie cérébrale amylo ide, le syndrome de Down, l'encéphalopathie traumatique chronique. Toutes ces maladies sont caractérisées par la formation de dépôts d'A $\beta$  insolubles dans le parenchyme cérébral auxquelles s'ajoutent un syndrome démentiel (McKee et al., 2013; Stein et al., 2015; Miller-Thomas et al., 2016).

#### **a. Agrégation de l'amylo ide- $\beta$**

Dans le CNS sain, il existe un équilibre entre les voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique qui assure un niveau constant d'A $\beta$  dans le parenchyme cérébral. Malheureusement, il peut advenir que cet équilibre soit rompu en faveur de la voie amyloïdogénique engendrant ainsi la hausse pathologique du niveau d'A $\beta$ .

i) *Hyperactivité de la voie amyloïdogénique*

L'agrégation du peptide A $\beta$  découle le plus souvent d'une hyperactivation de la voie de clivage amyloïdogénique de l'APP. Par exemple, il est montré que l'expression et l'activité de BACE-1 sont élevées dans le cerveau de patients atteints de la forme sporadique de la MA (Holsinger et al., 2002; Yang et al., 2003) suggérant ainsi que la hausse de l'activité de cet enzyme serait responsable de la hausse de l'A $\beta$ . De surcroît tel que vu précédemment, différents stress cellulaires comme que l'hypoxie (Wen et al., 2008), l'ischémie (Wen et al., 2004), le stress oxydatif (Tamagno et al., 2005) et l'inflammation (Hong et al., 2003) stimulent l'expression de BACE-1, ce qui fatalement augmente la synthèse de l'A $\beta$ . Ceci permet d'expliquer pourquoi les sujets victimes d'accidents vasculaires cérébraux ou de traumatismes crâniens sont à risque de développer une  $\beta$ -amyloïdose.

Des anomalies génétiques peuvent aussi rendre compte de la prépondérance de la voie amyloïdogénique. C'est ainsi que certaines personnes atteintes de la forme familiale de la MA expriment les mutations K670N et M671L de l'APP (ou mutation suédoise). Ces mutations favorisent le clivage de l'APP en faisant de ce dernier un meilleur substrat de BACE-1 (Citron et al., 1992; Citron et al., 1994). De même, les personnes atteintes du syndrome de Down (trisomie 21), présentent une copie surnuméraire du gène APP, ce qui provoque une surexpression de l'APP et la hausse de la synthèse d'A $\beta$ . Notons au passage que les sujets trisomiques manifestent une  $\beta$ -amyloïdose précoce et systémique, qu'accusent des syndromes démentiels particulièrement sévères. D'autres mutations affectant cette fois les PS1 et PS2 du complexe  $\gamma$ -sécrétase ont été décrites chez des patients atteints de variantes familiales de la MA. Ces mutations favorisent la formation

d'A $\beta_{42}$  au détriment de l'A $\beta_{40}$  (De Strooper et al., 1998; Hecimovic et al., 2004; Tanzi and Bertram, 2005; Shimojo et al., 2007). Or à l'opposé de ce dernier, l'A $\beta_{42}$  présente une forte tendance à l'agrégation et est essentiel à la formation de plaques séniles (Weggen and Behr, 2012).

ii) *Hypoactivité de la voie non amyloïdogénique*

Les  $\beta$ -amyloïdopathies peuvent également être la conséquence d'une baisse de l'activité de la voie de protéolyse non amyloïdogénique de l'APP. Il est montré que dans le cortex temporal des victimes de la forme sporadique de la MA, il y a une baisse de l'activité  $\alpha$ -sécrétase qui ne représente plus que 81 % de la normale (Tyler et al., 2002). Des analyses du liquide céphalorachidien de patients alzheimeriens révèlent aussi une baisse du niveau d'ADAM10 et de l'APP $\alpha$ , deux indicateurs d'une inhibition de l'activité  $\alpha$ -sécrétase (Colciaghi et al., 2002). Il est intéressant de noter que la surexpression d'ADAM 10 dans un modèle murin de la MA réduit la synthèse de l'A $\beta$  et prévient la formation de plaques séniles (Postina et al., 2004). Ceci indique donc que la voie non amyloïdogénique est hypoactive durant la MA.

**b. Déficits protéostatiques et accumulation de l'amyloïde- $\beta$**

Dans le parenchyme cérébral se trouve un système de contrôle de la protéostasie extracellulaire dont l'incapacité à prévenir l'agrégation de l'A $\beta$  pourrait être la cause de la  $\beta$ -amyloïdopathie. Les chaperons extracellulaires tels que la clusterine et l' $\alpha$ -2-Macroglobuline participent normalement à la clairance de l'A $\beta$  en formant des complexes avec ce dernier afin de permettre son drainage vers la circulation systémique ou vers le liquide céphalorachidien à l'aide des récepteurs éboueurs (Narita et al., 1997;

Bell et al., 2007). Les protéines clusterine et  $\alpha$ -2-Macroglobuline ont été observées dans les plaques séniles ce qui suggère une altération de leur capacité à favoriser le drainage de l'A $\beta$  (Wyatt et al., 2013).

La hausse du niveau d'A $\beta$  peut être également consécutive à une baisse de l'activité des différentes enzymes de dégradation de l'A $\beta$ . La protéase la plus importante pour la dégradation de l'A $\beta$  est la neprilysine, car l'inactivation de son gène engendre une hausse importante et dose dépendante du niveau de l'A $\beta$  (Iwata et al., 2001). La surexpression de la neprilysine dans des modèles murins de la MA réduit la charge amyloïde, prévient la formation des plaques et soulage des symptômes liés à la maladie, des effets révélateurs de l'implication de la neprilysine dans les  $\beta$ -amyloïdopathies (Leissring et al., 2003; Marr et al., 2003). L'exploitation de divers modèles de surexpression et d'inactivation *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier plusieurs autres protéases impliquées dans la dégradation de l'A $\beta$ , parmi lesquelles, l'enzyme de conversion de l'endothéline, l'enzyme de dégradation de l'insuline, et la cathepsine B (Eckman et al., 2003; Farris et al., 2004; Eckman et al., 2006; Mueller-Steiner et al., 2006). On peut donc spéculer que la formation de dépôts amyloïdes congophiliques observé dans les  $\beta$ -amyloïdopathies serait la conséquence d'une défaillance du système de clairance et de dégradation de l'A $\beta$ .

L'hyperproduction de l'A $\beta$  peu importe le motif, résulte en fin de compte en une hausse de sa concentration extracellulaire. Cette hausse lorsqu'elle persiste aboutit à l'appariement des monomères d'A $\beta$  en oligomères solubles lesquelles vont former des protofibrilles au cours du processus de nucléation. Les protofibrilles s'organiseront finalement en fibrilles plus stables, et présentant les propriétés physico-chimiques

associées aux structures amyloïdes (réaction positive à la thioflavine, biréfringence, conformation en feuillet- $\beta$ ). Enfin, il faut souligner que la tendance de l'A $\beta$  à l'oligomérisation et à l'agrégation est d'autant plus forte que le ratio A $\beta_{42}$ /A $\beta_{40}$  est élevé. Il en est de même pour la toxicité.

### **c. Mécanismes de toxicité de l'amyloïde- $\beta$**

Des études chez les humains et sur des modèles animaux font état d'une abondance de radicaux libres dans les plaques séniles, indiquant ainsi que l'accumulation de l'A $\beta$  dans le cerveau engendre un stress oxydatif notoirement toxique (McLellan et al., 2003). Des expériences ultérieures ont démontré que ce stress oxydatif apparaît d'abord dans les neurites des cellules situées à proximité des plaques séniles, puis se propage vers le soma causant la mort des neurones par apoptose (Garcia-Alloza et al., 2006; Xie et al., 2013). La formation d'agrégats d'A $\beta$  provoque le stress oxydatif en fixant les ions Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, et Zn<sup>2+</sup> via le résidu méthionine du peptide A $\beta$  (Chakrabarti et al., 2013). Ces ions une fois fixés interagissent avec les molécules avoisinantes qu'ils oxydent, conduisant ainsi à la libération de radicaux libres. Parallèlement, l'A $\beta$  est capable de causer directement le stress oxydatif via son résidu Met35 dont le groupement sulfhydryle (—SH) peut s'oxyder en perdant un électron en faveur du groupement carbonyle (—C=O) d'Ile31 afin de générer un radical sulfuranile (MetS<sup>+</sup>). L'A $\beta$ -[MetS<sup>+</sup>] ainsi formé oxyde les molécules situées à proximité y compris les protéines et les lipides membranaires (Butterfield et al., 2013). Il est montré chez un modèle transgénique de la MA que la substitution du résidu Met35 de l'A $\beta$  par la Leu abroge les dommages oxydatifs associés



au peptide A $\beta$ , démontrant ainsi l'implication directe de l'A $\beta$ -[MetS<sup>+</sup>] dans le stress oxydatif causé par la  $\beta$ -amyloïdopathie (Butterfield et al., 2010).

On a longtemps pensé que la toxicité de l'A $\beta$  était uniquement liée à la formation d'agrégats insolubles dans le parenchyme. Cependant, d'importantes quantités de dépôts amyloïdes sont observées chez des personnes âgées, et ce en absence d'altérations neuronales majeures, indiquant ainsi que les agrégats insolubles d'A $\beta$  ne sont pas nécessairement toxiques (Aizenstein et al., 2008b). On s'est rendu compte plus tard que les espèces coupables de la toxicité de l'A $\beta$  sont plutôt les oligomères solubles du peptide. En effet, les effets dévastateurs causés par le stress oxydatif sont surtout dus aux oligomères d'A $\beta$  qui peuvent diffuser librement à travers le tissu cérébral et y disséminer leurs effets délétères. Les oligomères d'A $\beta$  peuvent notamment s'insérer dans la bicouche lipidique pour y peroxyder les phospholipides via la MetS<sup>+</sup> altérant au passage l'homéostasie ionique tout en perforant la membrane plasmique (Mark et al., 1997).

Contrairement aux agrégats insolubles, l'injection d'oligomères solubles d'A $\beta$  (recombinants ou issus du cerveau de patients victimes de la MA) dans l'hippocampe de rongeurs provoque également des perturbations dans la transmission synaptique, la baisse de la densité synaptique, le tout résultant en des troubles cognitifs (Shankar et al., 2008; Balducci et al., 2010; Kittelberger et al., 2012). Les effets synaptotoxiques des oligomères d'A $\beta$  sont dus à la réduction de l'expression des récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) (Snyder et al., 2005; Hsieh et al., 2006) ainsi qu'à la baisse du niveau de la protéine d'échafaudage postsynaptique PSD-95 (post-synaptic density 95) (Almeida et al., 2005). Or toutes ces protéines synaptiques sont impliquées dans la PLT et la dépression à long terme (DLT),

des éléments de la plasticité synaptique essentiels entre autres à la formation et consolidations des traces mnésiques. Tout ceci démontre donc que les oligomères d'A $\beta$  en plus de causer un stress oxydatif sont aussi responsables des troubles synaptiques associés à la  $\beta$ -amyloïdose. De plus, dans la MA il existe une corrélation positive entre la concentration d'A $\beta$  soluble dans le cerveau et le niveau de déficits cognitifs ce qui renforce le concept de la toxicité des oligomères solubles d'A $\beta$  (Hardy and Selkoe, 2002).

Aux effets neurotoxiques de l'A $\beta$  que nous venons de décrire peuvent s'ajouter ceux liés à l'activation exacerbée de la réponse immunitaire. Les plaques séniles et surtout les oligomères d'A $\beta$  enclenchent la réponse inflammatoire en se fixant sur les récepteurs membranaires RAGE (Receptor of Advanced Glycation End product) et TLR (Toll Like Receptor) situés à la surface des microglies et des astrocytes (Yan et al., 1996; Chen et al., 2006). Cette fixation déclenche la mise en branle de la réponse inflammatoire initiée par l'activation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-kB. Ce dernier stimule la transcription de gènes codant pour les médiateurs pro-inflammatoires tels que TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, et MIP-1 (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) (Wyss-Coray, 2006). Ces médiateurs, non seulement activent les microglies et les astrocytes pour déclencher une gliose réactive, mais aussi renforcent leur propre production par rétrocontrôle positif. Normalement, cette réponse lorsqu'elle se fait dans des proportions limitées permet d'éliminer rapidement les dépôts protéiques et autres débris cellulaires. Mais la réponse inflammatoire est une arme à double tranchant, car elle présente aussi le danger si elle persiste d'activer les voies extrinsèques de l'apoptose et de causer un important stress oxydatif (Wyss-Coray, 2006). Il se trouve que dans les  $\beta$ -

amyloïdopathies, les molécules d'A $\beta$  ont subi des modifications post-traductionnelles, qui les rendent réfractaires à la dégradation par les microglies (De Strooper, 2010). Par conséquent, les microglies et les astrocytes demeurent activés en permanence et causent une neuroinflammation chronique responsable de la neurodégénérescence (Meraz Rios et al., 2013).

### **1.3.3. La vulnérabilité des neurones aux troubles de la protéostasie**

Nous avons vu au travers des exemples des tauopathies et des  $\beta$ -amyloïdopathies combien les neurones sont sensibles à toute altération de la protéostasie. Qu'est-ce qui explique cette grande vulnérabilité ?

Les neurones sont des cellules post-mitotiques dépourvues de capacités prolifératrices, exception faite des zones restreintes de neurogenèse dans le gyrus denté et la zone subventriculaire. C'est pourquoi contrairement aux cellules ayant conservé leurs propriétés mitotiques, les neurones ne peuvent pas diminuer leur charge protéique en le répartissant entre cellules filles. Toujours en raison de leur caractère post-mitotique, les neurones ont une très longue longévité. Raison pour laquelle les différents mécanismes de contrôle de la protéostasie perdent leur efficacité au fil des années; de telle sorte que les aberrations protéiques prennent plus de temps à être corrigées, ce qui favorise l'apparition d'inclusions protéiques. La forte dépendance des neurones au métabolisme oxydatif aggrave ce tableau déjà peu reluisant. On sait en effet que le métabolisme des cellules neurales est principalement de type aérobie, avec comme corollaire la production de radicaux libres, qui sont normalement neutralisés par les enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase, glutathione peroxidase, etc). Cependant avec l'âge des

défaillances s'installent dans le système d'élimination des radicaux libres. Ces derniers désormais libres d'interagir avec le protéome oxydent et altèrent la structure native des protéines. Parallèlement, la défaillance du métabolisme cellulaire diminue la production de l'ATP ce qui réduit la capacité des chaperons-ATP dépendants à assurer le contrôle qualité des protéines et limite l'aptitude du SUP et de l'agrèphagie à dégrader les protéines anormales. Tous ces changements concourent à la disruption de la protéostasie et à la formation d'agrégats protéiques neurotoxiques. Toutes ces raisons expliquent donc pourquoi de nombreuses protéinopathies revêtent un caractère neuropathologique indéniable et pourquoi l'âge en est le principal facteur de risque.

Dans le prochain chapitre, nous allons étudier ces troubles neuropathologiques en focalisant notre attention sur deux cas fréquents : le glaucome et la maladie d'Alzheimer. Nous allons commencer par le glaucome une maladie de la vue bien connue comme maladie neurodégénérative, mais dont le caractère protéinopathique est longtemps passé inaperçu. Ensuite, nous discuterons de la maladie d'Alzheimer la plus importante des protéinopathies neurodégénératives, produit du dysfonctionnement conjoint de tau et de l'A $\beta$ . Enfin, nous allons nous atteler à établir le lien pathologique existant entre ces deux affections.

Chapitre II.

**Glaucome et maladie d'Alzheimer**

## **2.1. Le glaucome : quand les cellules ganglionnaires de la rétine sont perdues de vue**

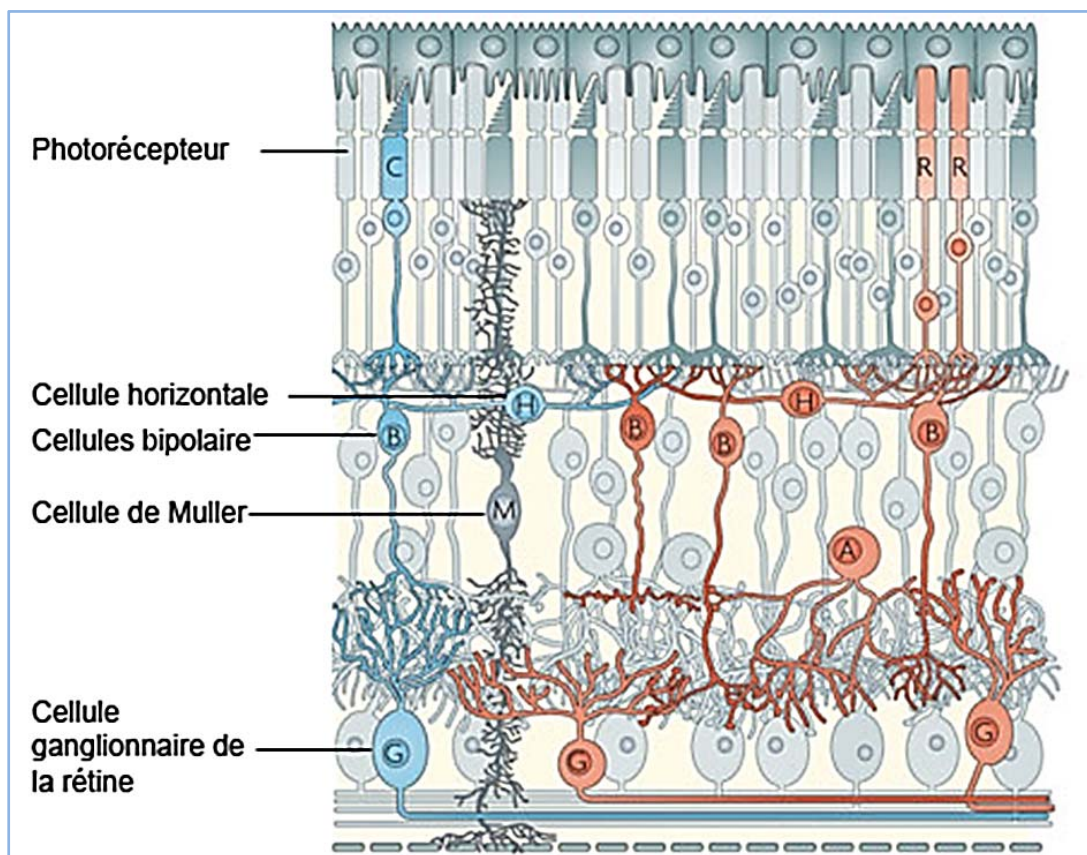
### **2.1.1. Définition et épidémiologie**

Le glaucome est une neuropathie optique caractérisée par la perte progressive des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et la dégénérescence du nerf optique (Foster et al., 2002). En vertu du consensus actuel, le diagnostic formel du glaucome est établi lorsque dans au moins un des yeux, on retrouve à la fois un déficit structurel (dommages au nerf optique) et fonctionnel (réduction du champ visuel) (Foster et al., 2002). D'après les dernières estimations, 60 millions de personnes à travers le monde souffrent du glaucome. En raison du vieillissement de la population, les prédictions prévoient qu'environ 80 millions de personnes seront atteintes d'ici 2020 (Quigley, 2011). Il n'existe actuellement aucun remède contre la maladie raison pour laquelle les personnes atteintes sont condamnées à vivre avec angoisse la perte inexorable de leurs capacités visuelles jusqu'à la cécité totale. Le glaucome représente d'ailleurs la première cause de cécité irréversible dans le monde, avec près de 8,4 millions de personnes aveugles suite à la maladie (Quigley, 2011). Pire encore, on prévoit que ce chiffre atteindra 10,2 millions à l'horizon 2020 ! C'est tout dire de l'urgence qui se pose en termes de solutions thérapeutiques visant à stopper le processus pathologique et à prévenir la cécité.

Étant donné que le glaucome est une rétinopathie, nous allons faire une brève description de la rétine avant d'entrer dans le vif du sujet.

### 2.1.2. Structure de la rétine

La rétine est le tissu nerveux à l'origine de la création l'information visuelle. Tapissant la couche la plus interne du globe oculaire, la rétine présente une structure stratifiée formée par l'agencement de 5 populations de neurones avec de l'extérieur vers l'intérieur les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacines, et les CGR (Figure 1). À ces neurones s'ajoutent les cellules gliales à savoir les cellules de Müller, les astrocytes et les microglies.



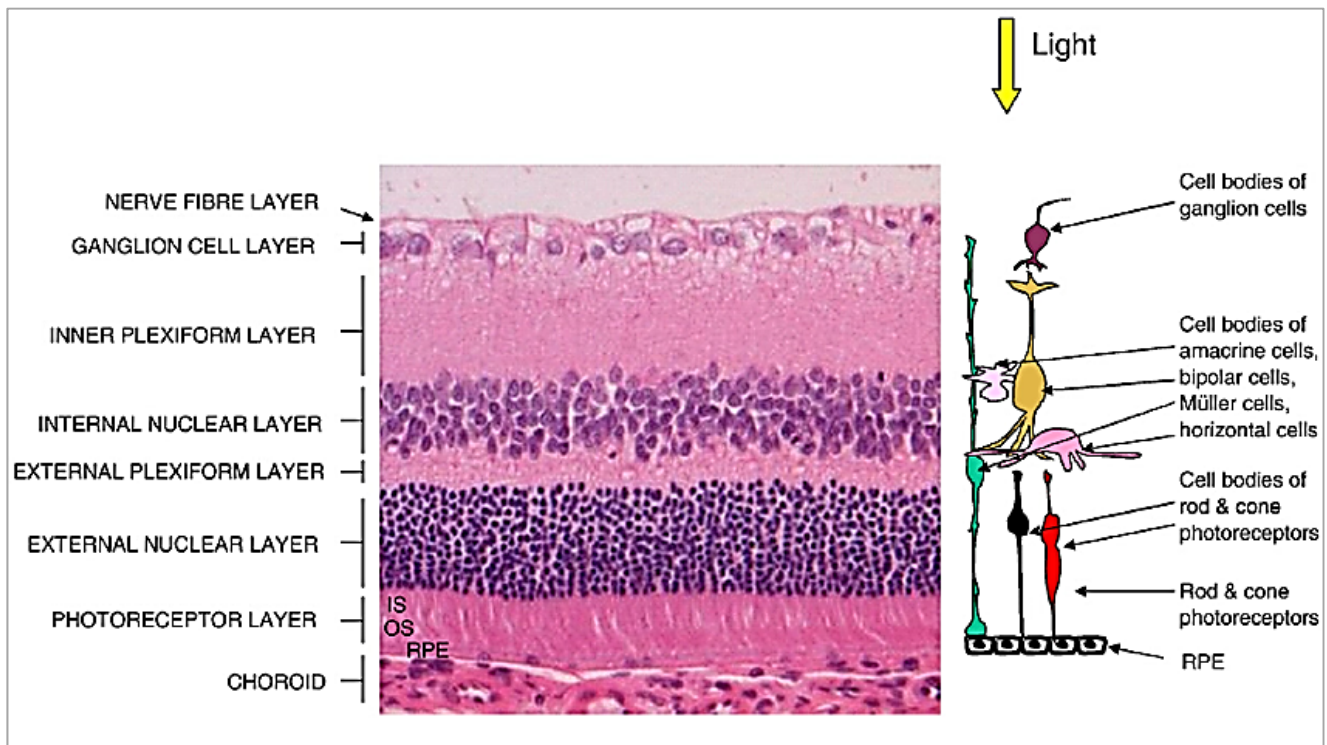
**Figure 1. Structure de la rétine.** Les photorécepteurs, créateurs du signal visuel nerveux, font synapses avec les neurones bipolaires, qui à leur tour relaient le signal aux CGR, chargées de son acheminement vers le cerveau. Cette transmission linéaire est modulée par l'inhibition latérale assurée respectivement par les cellules horizontales et les cellules amacines. Modifié de Swaroop et al. (2010).

La lumière qui entre dans l'œil est convertie en influx nerveux par les photorécepteurs (cellules à cônes et à bâtonnets), lequel est successivement transmis aux cellules bipolaires et aux CGR. Ces derniers acheminent enfin l'influx nerveux en direction du cerveau via leurs axones, qui après avoir parcouru la surface rétinienne, se regroupent au disque optique, ou point aveugle, pour former le nerf optique. Le relais du signal visuel entre photorécepteurs et cellules bipolaires d'une part et entre cellules bipolaires et CGR d'autre part, se fait par la transmission glutamatergique que modulent respectivement les cellules horizontales (GABAergiques) et les cellules amacrines (GABAergiques et glycinergiques). Les cellules gliales pour leur part jouent un rôle trophique à l'égard des neurones tout en assurant la préservation de l'homéostasie extracellulaire (Calkins, 2012).

Structurellement, la rétine est formée par la superposition de couches nucléaires et plexiformes aisément identifiable au microscope après coloration à l'hématoxyline et l'éosine (Figure 2). La couche la plus externe de la rétine correspond au segment externe (SE) où se trouvent les photorécepteurs équipés des pigments, la rhodopsine et les opsines, qui déclencheront une cascade biochimique à l'origine de la transformation du signal photonique en signal électrique. Ensuite vient la couche nucléaire externe (CNE) qui contient le soma des photorécepteurs. Les photorécepteurs établissent leurs contacts synaptiques avec les cellules bipolaires et horizontales au niveau de la couche plexiforme externe (CPE). Les corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales et amacrines sont localisés dans la couche nucléaire interne (CNI) ; on y trouve également le soma des cellules de Müller, dont les projections s'étendent radialement à travers toute la rétine. La couche rétinienne la plus épaisse est la couche plexiforme interne (CPI) formée par les



terminaisons axonales des cellules bipolaires faisant synapse avec les dendrites des CGR et des cellules amacrines. Ensuite vient la couche des cellules ganglionnaires (CCG) qui comme son nom l'atteste contient le soma des CGR auxquels s'ajoute celui des cellules amacrines déplacées. La couche des fibres nerveuses (CFN), dernière couche rétinienne, est formée par les axones non myélinisés des CGR (Figure 2).



**Figure 2. Observation microscopique d'une section de la rétine.** La coloration à l'hématoxyline et l'éosine d'une section sagittale de la rétine révèle qu'elle est formée par la superposition de 7 couches formées par l'alternance de somas et de projections cellulaires. Sur la droite sont illustrées les formations cellulaires correspondant à chaque couche. Modifié de Redfern et al. (2011).

### **2.1.3. Manifestations cliniques et facteurs risque du glaucome**

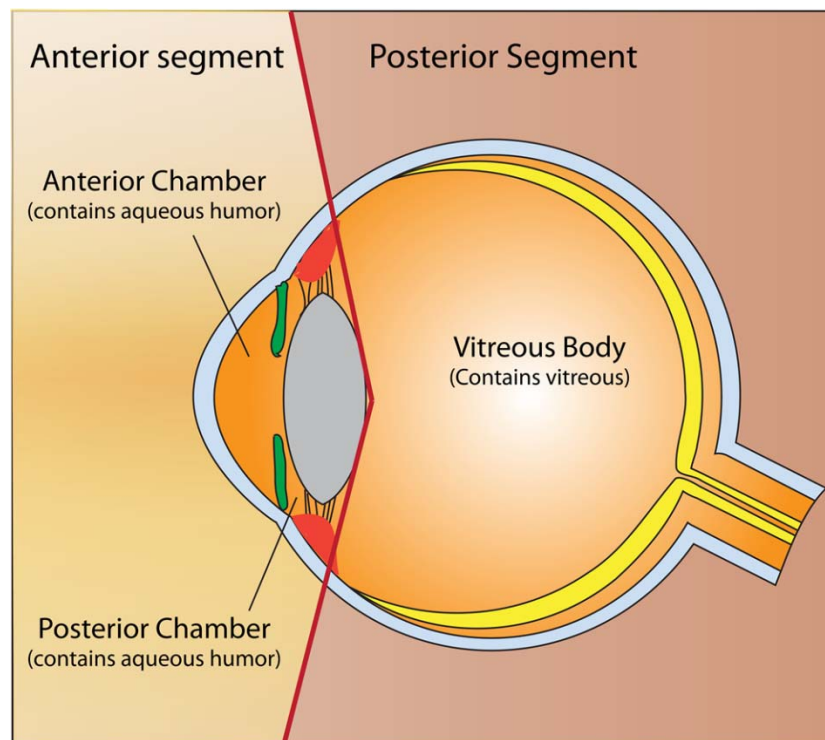
Les sujets atteints du glaucome présentent une réduction progressive du champ visuel allant de la périphérie vers le centre et décelable durant des tests de périmétrie (Quigley and Addicks, 1981; Brigatti et al., 1997; Garway-Heath et al., 2000), auquel s'ajoute une réduction de l'amplitude du pattern-électrorétinogramme (Pfeiffer and Bach, 1992; Ruben et al., 1995). Ces troubles visuels sont généralement précédés d'anomalies structurelles de la rétine interne, détectables après examen du fond de l'œil (Airaksinen et al., 1992; Zeyen and Caprioli, 1993; Garway-Heath et al., 2002). Ainsi, les premiers signes associés à la pathologie incluent le rétrécissement et l'excavation du disque optique, point de convergence des axones des CGR (Alexandrescu et al., 2010; Tatham et al., 2014). La hausse du ratio entre l'excavation et le diamètre du disque optique est révélatrice d'une neuropathie optique et reflète l'état d'avancement du glaucome. L'analyse des couches rétinienne à l'aide d'un tomodesitométré par cohérence optique ou d'un ophtalmoscope à balayage laser révèle également un amincissement des couches rétinienne où se trouvent les cellules ganglionnaires, ce qui est indicateur d'une dégénérescence neuronale (Raza et al., 2011; Bussel et al., 2014; Tatham et al., 2014). Ces changements structurels sont irréversibles et s'installent de manière insidieuse des années, voire des décennies, avant la manifestation des premiers troubles visuels (Hood and Kardon, 2007). De telle sorte que lorsque les déficits visuels deviennent apparents, le sujet présente déjà une perte substantielle de ses CGR (Quigley et al., 1992; Harwerth et al., 1999; Garway-Heath et al., 2000). C'est d'ailleurs pour cette raison que le glaucome est surnommé « le voleur silencieux de la vue ».

Bien qu'on ignore la cause du glaucome, on sait par contre qu'il existe plusieurs facteurs de risques. L'âge est le principal facteur de risque du glaucome, car en référence à ceux âgés de 40 ans, la prévalence du glaucome est de 4 à 10 fois plus élevée chez les personnes âgées de 60 ans (Hollows and Graham, 1966; Sommer et al., 1991; Tielsch et al., 1991; Klein et al., 1992). Comme autres facteurs également susceptibles de favoriser l'apparition de la maladie, on peut citer la hausse de la pression intraoculaire ou hypertension oculaire (HTO), l'ethnicité, l'hypertension artérielle (Leske, 1983; Wilson et al., 1987; Sommer et al., 1991; Jay and Murdoch, 1993; Sommer, 1996). De tous ces différents facteurs de risque, le plus important est l'HTO, car elle présente double la particularité d'être fortement corrélé au glaucome et d'être modifiable (Quigley et al., 1994; Leske et al., 1995; Kass et al., 2002; Pang and Clark, 2007; Sappington et al., 2010). Normalement, la pression intraoculaire chez l'homme oscille entre 15 et 21 mm Hg. Cependant, il a été montré que les personnes présentant une pression intraoculaire supérieure à 21 mm Hg ont 16 fois plus de risques de développer le glaucome que ceux ayant une pression inférieure à 16 mm Hg (Leibowitz et al., 1980; Sommer et al., 1991). En outre, le suivi de patients glaucomateux sur une période de 5 ans a révélé que le pourcentage de patients développant des déficits visuels est de 6.7 % pour ceux ayant une pression supérieure à 20 mm Hg comparativement à 1.5 % pour ceux ayant une pression inférieure à 20 mm Hg (Armaly et al., 1980). Finalement, il est prouvé que les déficits associés au glaucome sont plus importants dans l'œil présentant la pression intraoculaire la plus élevée (Cartwright and Anderson, 1988). Ces éléments illustrent donc l'importante relation existant entre la pression intraoculaire et le glaucome. De manière

intéressante, l'HTO sert de base à de multiples modèles animaux du glaucome sur lesquels nous reviendrons dans la section correspondante.

#### 2.1.4. Pression intraoculaire et glaucome

Le globe oculaire peut être décrit comme étant divisé en deux cavités remplies de fluides, à avoir le segment antérieur et le segment postérieur. Le segment antérieur qui contient l'humeur aqueuse est délimité par la cornée, le cristallin, et les ligaments suspenseurs. Le segment postérieur qui renferme l'humeur vitrée de consistance visqueuse est quant à lui circonscrit par le cristallin, les ligaments suspenseurs et la rétine (Figure 3).



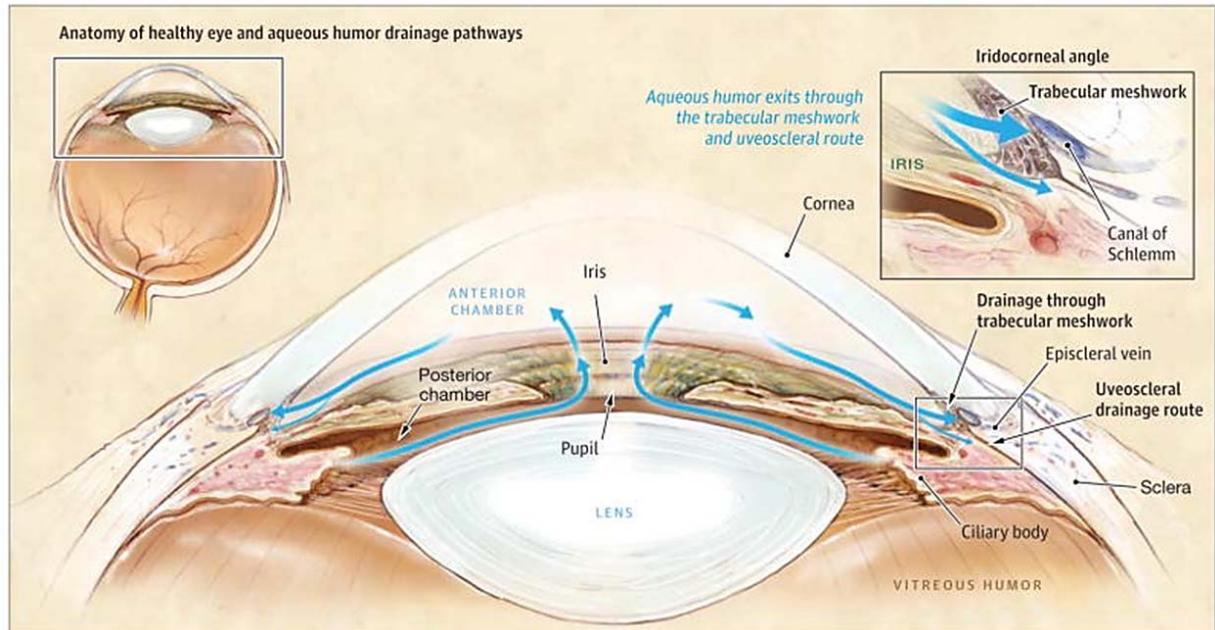
**Figure 3. Segments du globe oculaire avec leur fluide respectif.** Le segment antérieur (subdivisé en chambre antérieure et postérieure) est rempli d'humeur aqueuse. Le segment postérieur renferme l'humeur vitrée.

La présence de ces deux humeurs confinées dans des espaces clos fait en sorte qu'il existe en permanence une pression dans le globe oculaire, ce qui confère à l'œil sa turgescence. Cependant, l'humeur vitrée en raison de sa nature visqueuse n'est pas résorbée et demeure statique dans le segment postérieur tandis que l'humeur aqueuse, dont la densité et la viscosité sont proches de celle de l'eau, est drainée en permanence. Par conséquent, l'hypertension oculaire souvent associée au glaucome est nécessairement la conséquence d'anomalies dans la dynamique circulatoire de l'humeur aqueuse. Avant de discuter de ces anomalies, nous allons décrire le cycle de formation et de drainage de l'humeur aqueuse.

#### **2.1.4.1. Formation et drainage de l'humeur aqueuse**

Le segment antérieur de l'œil est subdivisé en une chambre antérieure comprise entre la cornée et l'iris et une chambre postérieure délimitée par l'iris et le cristallin. L'humeur aqueuse est sécrétée dans la chambre postérieure de l'œil par le réseau capillaire des corps ciliaires. Elle s'écoule ensuite à travers la pupille en direction de la chambre antérieure. Dans ce compartiment, l'humeur aqueuse est drainée vers le canal de Schlem au travers du trabéculum situé dans l'angle iridocornéen. Du canal de Schlem, l'humeur aqueuse pourra ensuite diffuser vers les veines épisclérales situées à proximité afin de rejoindre la circulation systémique (Figure 4). Le volume total de fluide présent dans le segment antérieur, et par ricochet la pression intraoculaire, résulte de l'équilibre entre la formation et le drainage de l'humeur aqueuse. Cet équilibre est contrôlé dans le trabéculum par les cellules de la région juxtacanaliculaire contiguë au canal de Schlem. Plus précisément, les cellules de la région juxtacanaliculaire régulent la pression intraoculaire en modulant la composition de leur matrice extracellulaire de manière à

augmenter ou à réduire le passage du fluide (Keller and Acott, 2013). Par conséquent, tout obstacle à l'écoulement de l'humeur aqueuse résulte en une accumulation du fluide dans le segment antérieur de l'œil. Selon qu'il y a obstruction ou pas dans la résorption de l'humeur aqueuse on distingue plusieurs types de glaucomes.



**Figure 4. Formation et drainage de l'humeur aqueuse.** L'humeur aqueuse produite dans la chambre postérieure par les corps ciliaires s'écoule par la pupille vers la chambre postérieure. Dans l'angle iridocornéen de la chambre antérieure, l'humeur aqueuse est résorbée vers le canal de Schlemm en empruntant le trabéculum pour être enfin drainée par la veine épisclérale (circulation de l'humeur aqueuse indiquée par les flèches bleues). Modifié de Weinreb et al. (2014).

#### 2.1.4.2. Glaucome à angle ouvert

Le glaucome à angle ouvert est de loin la principale variante de glaucome liée à l'HTO avec 74 % des cas recensés mondialement (Quigley and Broman, 2006). Le glaucome à angle ouvert résulte de l'augmentation de l'humeur aqueuse dans le segment

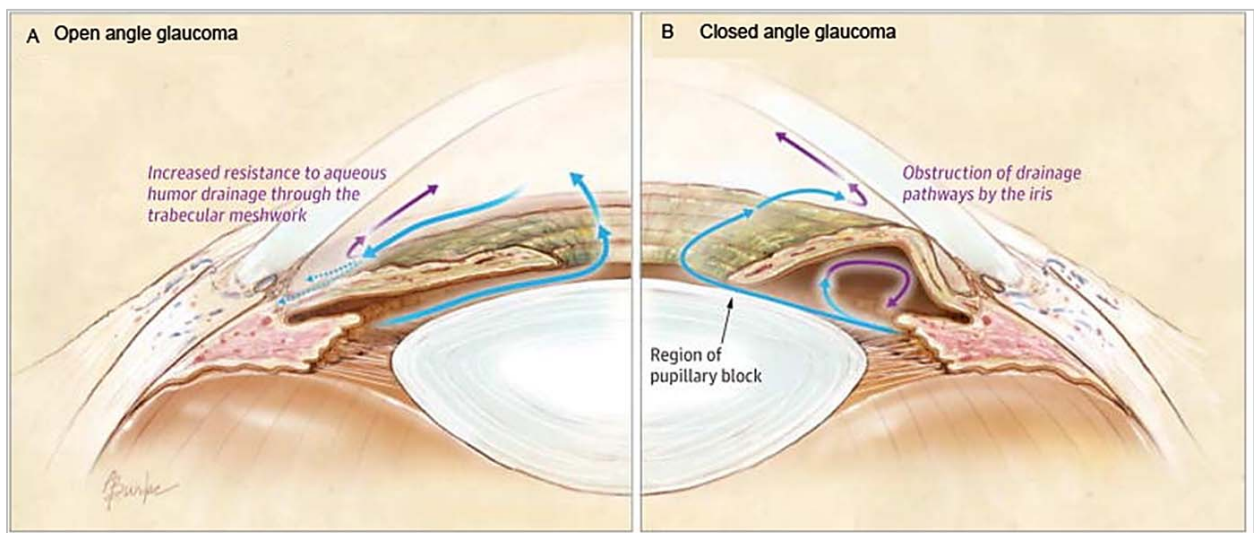
antérieur suite au blocage de son évacuation à travers le trabéculum bouché. L'obstruction du trabéculum est due à la dégénérescence des cellules de la région juxtacanaliculaire ou à l'altération de leur matrice extracellulaire (Keller and Acott, 2013). L'accumulation de l'humeur aqueuse augmente la pression dans le segment antérieur de l'œil, ce qui est tout de suite répercuté dans le segment postérieur où elle exercera des effets délétères sur la rétine (Figure 5A).

Le glaucome à angle ouvert survient typiquement chez les sujets du troisième âge et sa prévalence augmente avec le vieillissement (Leske et al., 1995), confirmant ainsi que l'âge est un important facteur dans le développement de la maladie. Le glaucome à angle ouvert affecte très souvent les deux yeux. En revanche, l'étendue des lésions est généralement asymétrique. Il est important de signaler que bien que la majorité des personnes atteintes de glaucome à angle ouvert manifestent une HTO (tension intraoculaire  $\geq 21$  mmHg) (Leibowitz et al., 1980; Bengtsson, 1981; Sommer et al., 1991), la plupart des sujets ayant une pression intraoculaire au-dessus de la normale ne développent pas pour autant la maladie (Friedman et al., 2004). Ceci indique que l'HTO n'est pas une condition *sine qua non* du glaucome.

#### **2.1.4.3. Glaucome à angle fermé**

Le glaucome à angle fermé représente environ 26 % des cas de glaucome lié à l'HTO, parmi lesquels 87 % se retrouvent chez les personnes d'ascendance asiatique (Quigley and Broman, 2006). Cette maladie est caractérisée par la réduction de l'angle iridocornéen (angle entre l'iris et la cornée) suite à l'apposition de l'iris contre la cornée. Ceci obstrue le passage de l'humeur aqueuse de la chambre postérieure vers la chambre

antérieure (Figure 5B). La réduction de l'angle iridocornéen cause aussi une adhérence de l'iris au trabéculum, bloquant davantage la circulation de l'humeur aqueuse (Foster et al., 2002; Quigley, 2011). Ces changements sont parfois associés à la formation de dépôts pigmentés à la surface du trabéculum (Foster et al., 2002). Les effets combinés des anomalies susmentionnées créent une accumulation de l'humeur aqueuse dans le segment antérieur de l'œil, ce qui conduit à l'installation d'une HTO responsable de la dégénérescence rétinienne.



**Figure 5. Anomalies de drainage de l'humeur aqueuse dans le glaucome. (A)**

Dans le glaucome à angle ouvert, il y a une résistance au passage de l'humeur aqueuse à travers du réseau trabéculaire. Dans le glaucome à angle fermé, l'angle iridocornéen est réduit ce qui interfère avec la circulation de l'humeur aqueuse. Dans les deux cas, l'humeur aqueuse non drainée s'accumule dans le segment antérieur de l'œil et cause la hausse de la pression intraoculaire. Modifié de Weinreb et al. (2014).



#### **2.1.4.4. Glaucome à tension normale**

Nous avons vu que la hausse de la pression intraoculaire n'implique pas toujours le glaucome. Réciproquement, la dégénérescence glaucomateuse peut survenir alors que la pression intraoculaire est normale ( $\leq 21$  mmHg) (Sommer et al., 1991). Dans le cas d'espèce, on parle de glaucome à tension normale. Sur le plan clinique, cette maladie est en tout point similaire aux glaucomes à angle ouvert et fermé, avec les mêmes troubles visuels et la même neuropathie optique. Hormis la pression intraoculaire constante, il existe néanmoins d'autres indices permettant de distinguer le glaucome à tension normale des autres variantes de la maladie. Parmi ceux-ci, on peut citer par exemple le rétrécissement plus marqué de la bordure du disque optique, l'atrophie péripapillaire plus importante et la présence d'hémorragies dans la rétine (Caprioli and Spaeth, 1985; Tezel et al., 1996; Ishida et al., 2000).

Il a été proposé que le glaucome à tension normale est la conséquence d'anomalies dans le lit vasculaire de la rétine interne, comme le témoigne justement la présence d'hémorragies dans le disque optique et la baisse de l'irrigation sanguine péripapillaire (Chung et al., 1999; Ishida et al., 2000). Ces troubles vasculaires seraient entre autres causés par une dérégulation de l'endothéline-1, un puissant vasoconstricteur (Kedzierski and Yanagisawa, 2001; Chan et al., 2016). Il est en effet prouvé que les victimes de glaucome à tension normale présentent une hausse d'endothéline-1 dans le plasma et dans l'humeur aqueuse (Kaiser et al., 1995; Sin et al., 2013). Cette hausse en créant un vasospasme permanent, limiterait l'irrigation sanguine dans la rétine interne causant ainsi la perte des CGR. De surcroît, des expériences sur préparations artérielles issues de biopsies humaines montrent qu'à dose égale, la vasoconstriction causée par

l'endothéline-1 est plus forte chez les victimes de glaucome à tension normale que chez les sujets sains (Buckley et al., 2002). Ceci suggère que dans cette maladie il y aurait une hyperactivation de la signalisation intracellulaire de l'endothéline-1, exacerbant ainsi les effets liés à sa hausse locale. Il se dégage de ces études que le dysfonctionnement de l'endothéline-1 dans la rétine peut aussi provoquer la dégénérescence des CGR, ceci en absence d'hypertension intraoculaire.

### **2.1.5. Modèles expérimentaux du glaucome**

Les avancées réalisées dans la compréhension de la pathophysiologie du glaucome sont dans une large mesure redevables aux modèles animaux de la maladie. Ces modèles dans leur très grande majorité reposent sur l'HTO. Le principe de base pour induire une HTO chez un animal est de reproduire dans la chambre antérieure de l'œil, les mêmes changements que ceux associés à l'obstruction de la circulation de l'humeur aqueuse chez l'homme. Les animaux les plus fréquemment utilisés à cet effet sont les souris, les rats et dans une moindre mesure les singes.

#### **2.1.5.1. Modèles de glaucome à angle ouvert**

Dans ce modèle, le but est de limiter le passage de l'humeur aqueuse vers la veine épisclérale. L'un des premiers modèles de glaucome à angle ouvert fut produit chez des singes rhésus par photocoagulation du trabéculum au laser (Gaasterland and Kupfer, 1974). Depuis lors, la cautérisation du trabéculum ou de la veine épisclérale sont couramment utilisés pour induire l'HTO chez les souris et les rats (Sawada and Neufeld, 1999; Levkovitch-Verbin et al., 2002; Ruiz-Ederra and Verkman, 2006; Fu and Sretavan,

2010). Ce procédé produit une hausse rapide, mais transitoire de la pression intraoculaire, ce qui la rend peu convenable pour des études à long terme.

Le glaucome à angle ouvert peut également être induit chez les rats par destruction des veines épisclérales à l'aide d'un choc osmotique créée par injection d'une solution de NaCl hypertonique dans le modèle de Morrison (Morrison et al., 1997) ou par ligature d'une veine épisclérale (Yu et al., 2006). Le modèle de Morrison en particulier offre l'avantage de produire une hausse progressive, reproductible, et chronique de la pression intraoculaire. Cette hausse est corrélée à la perte progressive des somas et des axones des cellules ganglionnaires, apparents dès la première semaine post-induction de l'HTO (Morrison et al., 1997; Almasieh et al., 2010). Ces caractéristiques permettent non seulement de simuler au mieux la pathologie humaine, mais aussi d'étudier des changements pathologiques survenant dans les phases précoces de la maladie, c'est-à-dire ceux à l'origine de la perte des CGR. C'est en raison de ces avantages que nous avons décidé d'utiliser ce modèle pour mener les études présentées dans cette thèse. Cependant, l'inconvénient de ce modèle est qu'il n'est pas applicable aux souris en raison de la petite taille des veines épisclérales. Ce qui limite considérablement la réalisation d'études sur des souris exprimant des mutations génétiques d'intérêt.

#### **2.1.5.2. Modèles de glaucome à angle fermé**

Le principe de ce modèle est de créer une réduction de l'angle iridocornéen afin d'obstruer la circulation de l'humeur aqueuse vers la chambre antérieure. Les souris DAB/2J représentent un exemple héréditaire de glaucome à angle fermé. Chez ces dernières l'HTO est la conséquence de mutations génétiques qui provoquent l'atrophie de

l'iris, la dispersion du pigment iridien et une adhésion de l'iris à la cornée, des anomalies qui réduisent l'angle iridocornéen (Scholz et al., 2008). Les souris DAB/2J développent une hausse progressive de la pression intraoculaire à partir du 6<sup>ème</sup> mois d'âge résultant en une perte des CGR (Schuettauf et al., 2002; Moon et al., 2005; Scholz et al., 2008). Chez ces derniers l'élévation de la pression intraoculaire est maintenue à travers le temps et la dégénérescence glaucomateuse apparaît lentement au fil des mois mimant ainsi la pathologie humaine. Le problème avec le modèle DAB/2J est qu'il représente à vrai dire un modèle de glaucome secondaire, vu qu'il résulte de la dispersion du pigment iridien dans la cornée. De surcroît chez ces animaux il y a une altération du profil de l'électrorétinogramme qui survient avant l'installation de l'HTO (Harazny et al., 2009), ainsi qu'une réduction du nombre de cellules amacrines (Moon et al., 2005). Sous ces aspects les souris DAB/2J ne reflètent pas réellement le glaucome clinique.

Un autre modèle, inductible cette fois, de glaucome à angle fermé peut être créé par injection à travers la cornée de microbilles dans le segment antérieur de l'œil. Ces billes vont se réfugier dans l'angle iridocornéen où elles bloquent le flux de l'humeur aqueuse de la chambre postérieure vers la chambre antérieure. Ceci cause la hausse progressive et soutenue de la pression intraoculaire résultant en une perte du soma et des axones des CGR (Sappington et al., 2010; Ito et al., 2016). Ainsi contrairement au modèle DAB/2J, cette procédure modélise très bien le glaucome à angle fermé primaire. L'injection des microbilles à travers la cornée lorsqu'elle est réalisée chez des souris transgéniques permet d'étudier les effets de différentes manipulations génétiques sur la survie des CGR. Par contre, la principale limite de ce modèle est que la perte neuronale

est modérée, et atteint rapidement un plateau dès la 3<sup>ème</sup> semaine post-induction du glaucome (Ito et al., 2016).

### **2.1.5.3. Modèles de glaucome à tension normale**

Il existe de nombreux modèles expérimentaux de dégénérescence glaucomateuse caractérisés par l'absence d'anomalies circulatoires de l'humeur aqueuse. Il est notamment prouvé que l'injection intravitréenne de l'endothéline-1 chez des rats et des lapins engendre l'hypoperfusion de la tête du nerf optique résultant en une perte des CGR (Cioffi et al., 1995; Chauhan et al., 2004; Lau et al., 2006; Sasaoka et al., 2006). Ce qui montre que ce modèle présente les changements pathologiques associés au glaucome avec une pression oculaire normale. Néanmoins, l'administration chronique d'endothéline-1 lorsqu'elle est effectuée chez les rats présente l'inconvénient majeur de ne pas causer d'excavation du disque optique, alors que ce changement structurel constitue une signature pathologique majeure du glaucome (Chauhan et al., 2004).

Le glaucome à tension normale peut aussi être simulé en activant la neurotoxicité du glutamate dans la rétine afin de détruire spécifiquement les CGR par excitotoxicité. C'est cette stratégie qui est mise à contribution chez des souris transgéniques exprimant la forme inactive du transporteur GLAST (glutamate/aspartate transporter) exprimés par les cellules de Müller ou du transporteur EAAC1 (excitatory amino acid carrier 1) exprimés par les neurones rétinien dont les CGR (Harada et al., 2007). Ces modèles offrent l'avantage de reproduire fidèlement le phénotype glaucomateux dans un contexte de pression intraoculaire normale, permettent ainsi l'étude des mécanismes de mort dégénérescences des CGR indépendamment de l'HTO. Néanmoins, ces modèles

transgéniques ont une pertinence limitée pour ce qui a trait au glaucome clinique étant donné l'absence d'évidences en faveur d'une contribution des transporteurs GLAST et EAAC1 dans la pathologie humaine. Bien au contraire, il est montré que chez l'humain le polymorphisme pour le gène de GLAST n'est pas associé au glaucome à tension normale (Yasumura et al., 2011), suggérant ainsi que le système de transport du glutamate n'est pas impliqué dans la pathogenèse de la maladie.

On ne saurait clore la discussion sur les modèles animaux sans mentionner le modèle de lésion du nerf optique qui peut être obtenue par section (axotomie) ou par écrasement (Pang and Clark, 2007). Bien qu'au sens strict du terme ce modèle ne soit pas celui du glaucome, il reste une manière très populaire et hautement reproductible d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de mort des CGR *in vivo*. Toutefois, la précaution à prendre dans ce modèle est de ne pas provoquer de dommage à l'artère et la veine centrale du nerf optique afin de ne pas créer plutôt un modèle d'ischémie.

En définitive, peu importe la stratégie adoptée, un modèle du glaucome pour être valide doit remplir un certain nombre de critères cardinaux dont la perte des cellules ganglionnaire, la dégénérescence du nerf optique et la préservation des autres couches rétiniennes.

#### **2.1.6. Mécanismes de mort cellulaire dans le glaucome**

À l'échelle cellulaire, le glaucome est l'aboutissement de multiples processus pathologiques survenant dans les différents compartiments de la CGR, qui se soldent par une mort cellulaire lente et progressive. Bien que beaucoup reste à faire en terme de recherche fondamentale et préclinique, des progrès appréciables ont été réalisés dans la

compréhension des mécanismes à l'origine de la mort des cellules ganglionnaires. Dans un souci de clarté et de concision, nous allons décrire les principaux événements qui président à la mort des CGR durant le glaucome en nous référant aux compartiments cellulaires concernés, à savoir le soma, l'axone, et les dendrites.

#### **2.1.6.1. Dégénérescence du soma des CGR**

Il existe un large faisceau de preuves issues d'études chez des sujets humains et des modèles expérimentaux qui démontrent que la perte du soma des CGR lors du glaucome se fait par apoptose (Garcia-Valenzuela et al., 1995; Kerrigan et al., 1997; Cordeiro et al., 2004). L'apoptose des CGR est due aux effets combinés de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui convergent tous dans le soma neuronal pour y activer la caspase-3, ultime exécutrice du processus de suicide cellulaire (McKinnon et al., 2002).

##### **a. Voies intrinsèques de l'apoptose**

La mort des CGR peut être le fait de facteurs endogènes qui suivant diverses modalités déclenchent une activation des voies de signalisation de l'apoptose. Ici, le sort de la cellule est décidé au niveau des mitochondries après intégration des signaux proapoptotiques véhiculés par Bax et Bak et des signaux antiapoptotiques dont Bcl-2 et Bcl-X sont les médiateurs. La prépondérance des signaux proapoptotiques provoquent la libération du cytochrome c mitochondrial qui ensemble, avec Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) et la procaspase-9, formeront l'apoptosome, un des activateurs de la caspase-3 (Almasieh et al., 2012). Bax stimule aussi la libération de Smac par les

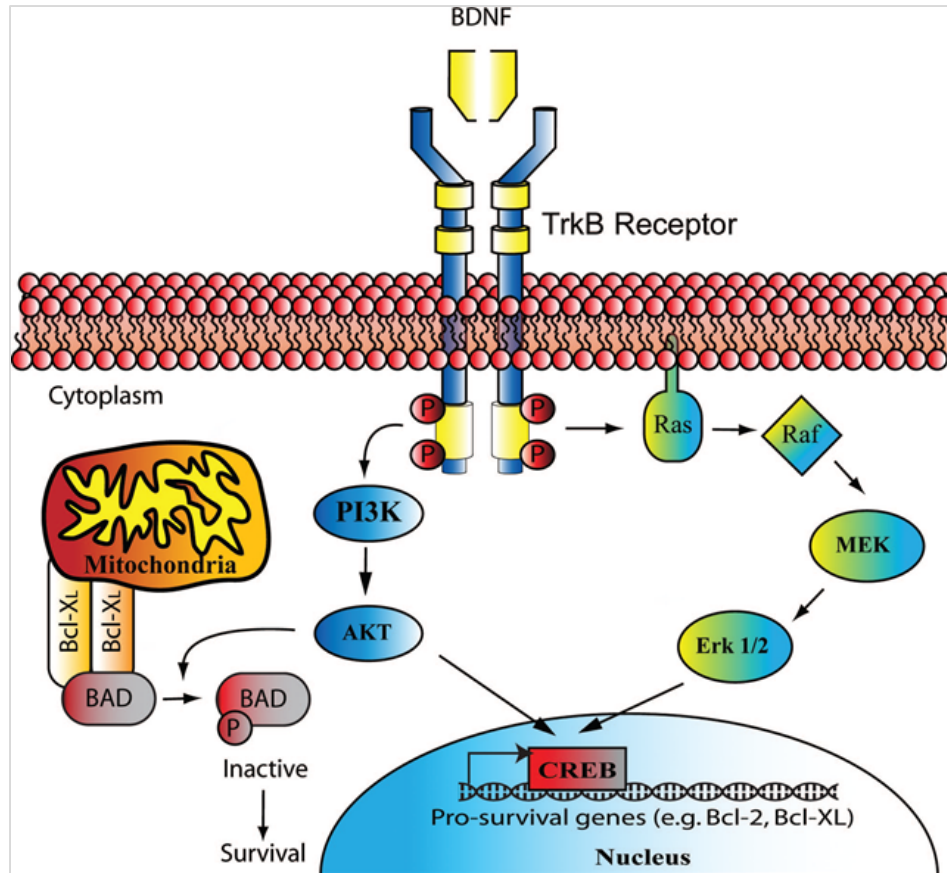
mitochondries, lequel se fixe sur IAP (inhibitor of apoptosis protein) afin d'abroger l'effet inhibiteur de ce dernier sur la caspase-3.

Selon l'hypothèse de la privation en neurotrophines, la baisse de la signalisation des neurotrophines dans le glaucome serait responsable de la perte des CGR par activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Rappelons que les neurotrophines sont des molécules essentielles à la survie et la différenciation des neurones. Elles agissent en réprimant les voies proapoptotiques et en stimulant les voies prosurvies. La famille des neurotrophines est composée de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NGF (Nerve Growth Factor), NT-3 (Neurotrophin-3) et NT-4/5 (Neurotrophin-4/5) (Huang and Reichardt, 2001; Bothwell, 2014). Les neurotrophines agissent en activant la famille de récepteurs tyrosine kinase Trk (tropomyosin receptor kinase).

La neurotrophine la plus importante pour la survie des CGR est le BDNF (Mansour-Robaey et al., 1994; Watanabe et al., 1997; Ma et al., 1998). Des expériences sur rongeurs montrent effectivement que le BDNF est fortement exprimé dans le colliculus supérieur, la cible principale des CGR dans le cerveau (Hofer et al., 1990), puis transporté de manière rétrograde le long du nerf optique vers la rétine (Ma et al., 1998). Dans les CGR, la liaison du BDNF avec son récepteur TrkB active la voie PI3K (phosphatidylinositol -3-kinase)/Akt laquelle phosphoryle à son tour le facteur proapoptotique BAD (Bcl-2 associated death domain). La phosphorylation de BAD lève l'inhibition que celui-ci exerce sur les agents prosurvies Bcl-2 et Bcl-XL ce qui promeut la survie des neurones. Akt stimule aussi l'expression de CREB (cAMP response element binding protein), facteur de transcription des gènes de Bcl-2 et Bcl-XL. Parallèlement le BDNF par le biais de MEK1 (Map-Erk-Kinase1) active la voie Erk1/2 (extracellular



regulated kinase 1/2) qui stimule CREB (Figure 6) (Kaplan and Miller, 2000; Lebrun-Julien and Di Polo, 2008). Il en résulte que tout événement susceptible de baisser le niveau de BDNF dans la rétine pourrait avoir des effets dramatiques sur la survie des CGR.



**Figure 6. Signalisation du BDNF et voies de survie intrinsèque des CGR.** La fixation de BDNF à son récepteur TrkB conduit à la phosphorylation de ce dernier, ce qui déclenche l'activation de la voie PI3K/AKT. Cette voie en inactivant BAD, lève son effet inhibiteur sur le facteur antiapoptotique Bcl-XL ce qui promeut la survie neuronale. De plus la voie PI3K/AKT stimule l'activation de CREB un puissant facteur de transcription de gènes pro-survie dont les Bcl. La phosphorylation de TrkB peut aussi stimuler l'activation du facteur CREB par l'intermédiaire de la voie Erk1/2. Tiré de Lebrun-Julien and Di Polo (2008).

Un argument en faveur l'hypothèse de la privation en neurotrophines est le fait que dans les CGR de modèles expérimentaux, l'HTO provoque une baisse du transport rétrograde du BDNF provenant du colliculus supérieur (Pease et al., 2000; Quigley et al., 2000). En outre, l'expression de l'ARNm de TrkB est fortement réduite chez les CGR en cas d'HTO ou d'axotomie du nerf optique (Cheng et al., 2002; Jia et al., 2004) ce qui aggrave les effets liés à la baisse de l'approvisionnement en BDNF. Il est intéressant de noter que l'administration du BDNF soit par transfection virale ou par injection du peptide recombinant augmente la survie des CGR durant le glaucome (Ko et al., 2000; Ko et al., 2001; Martin et al., 2003). Toujours en appui au modèle de privation en neurotrophine, il est montré que dans la rétine l'activation des voies de survies placées en aval des récepteurs Trk varie avec l'évolution du glaucome. Au début de la maladie, il y a une hausse de la phosphorylation d'Akt, ce qui inactive BAD et stimule CREB, deux réponses aux effets pro-survie. Par contre avec la progression de la maladie, la phosphorylation d'Akt diminue ce qui lève l'inhibition sur BAD et réprime l'expression de CREB, avec comme résultante l'activation des voies pro-apoptotiques (Kim and Park, 2005). Selon cette étude, la mort des CGR serait la conséquence d'une altération de la signalisation des neurotrophines, qui augmente au début de la pathologie puis pour des raisons inconnues, s'estompe rapidement laissant libre cours aux voies pro-apoptotiques. Pris dans l'ensemble ces études indiquent que la baisse de la signalisation du BDNF joue un rôle primordial dans la mort des CGR durant le glaucome.

Toutefois l'hypothèse de la privation en neurotrophine bien qu'intéressante ne permet pas d'expliquer certaines observations expérimentales pour le moins troublantes. Dans un premier temps, l'étude chronologique de la mort neuronale pendant et après

induction de l'HTO montre qu'en réalité la supplémentation en neurotrophines n'augmente pas la survie des CGR, mais ralentit plutôt la cinétique de mort cellulaire (Ko et al., 2001; Di Polo et al., 1998). Ce qui veut dire que la seule baisse de la signalisation des neurotrophines ne suffit pas à rendre compte de la perte des CGR dans la maladie (Di Polo et al., 1998).

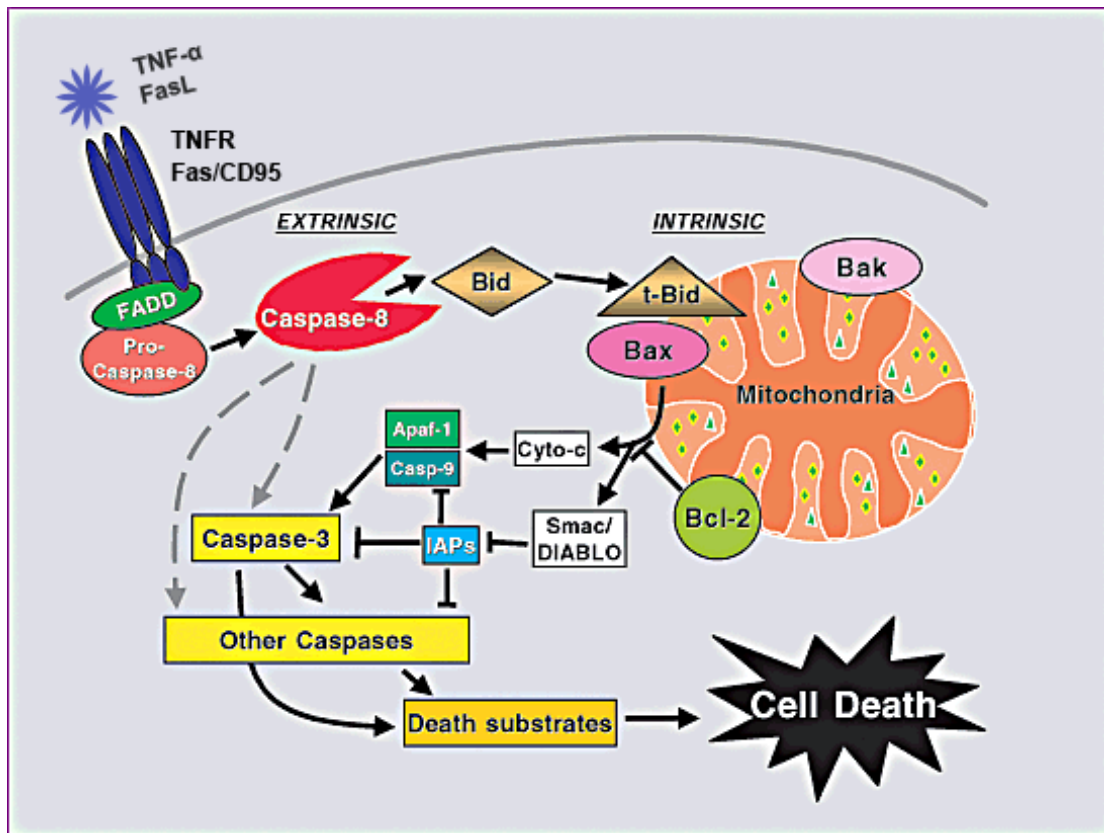
De plus, l'application intraoculaire de BDNF chez le rat sain ou ayant subi une axotomie du nerf optique diminue l'expression génique et protéique de TrkB; ce qui démontre l'existence dans la rétine d'un rétrocontrôle négatif du BDNF sur son récepteur (Chen and Weber, 2004; Cheng et al., 2002). Dans ce cas on devrait s'attendre à ce que la baisse du transport de BDNF consécutive à l'HTO provoque une hausse du niveau de TrkB ; curieusement, il se produit plutôt une réduction du niveau d'ARNm du récepteur (Jia et al., 2004; Guo et al., 2009), tandis que le niveau de la protéine reste inchangé (Guo et al., 2009). Ceci illustre bien la complexité de la signalisation du BDNF lors du glaucome, un aspect que l'hypothèse de la privation en neurotrophine ne reflète pas.

Qu'à cela ne tienne, la voie intrinsèque de l'apoptose joue un rôle crucial dans le glaucome puisque l'inactivation de BAX chez des souris glaucomateuses engendre une hausse dose-dépendante de la survie des CGR (Libby et al., 2005a). Il se trouve que hormis la signalisation des neurotrophines, des anomalies mitochondriales peuvent aussi déclencher la réponse apoptotique intrinsèque en provoquant la libération du cytochrome. Il est justement montré que les sujets glaucomateux présentent des signes de dysfonctionnement de la fonction mitochondriale (Abu-Amero et al., 2006; Lee et al., 2012) sans doute en raison du stress oxydatif ou de la crise énergétique liée aux troubles vasculaires (Chrysostomou et al., 2013).

## **b. Voies extrinsèques de l'apoptose**

La mort des CGR peut être aussi due à l'activation des récepteurs de la mort par les ligands TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha) et FasL (Fas Ligand) deux membres de la superfamille des cytokines TNF (Tumor Necrosis Factor), dont l'expression augmente durant le glaucome (Tezel et al., 2001; Kim and Park, 2005; Husain et al., 2012; Cueva Vargas et al., 2015). Ces ligands sont produits dans le cadre de la réponse inflammatoire initiée par les microglies et des cellules de Müller (Tezel et al., 2001; Kim and Park, 2005; Lebrun-Julien et al., 2009). La fixation des ligands TNF $\alpha$  et FasL respectivement sur TNFR (TNF $\alpha$  receptor) et Fas est suivie du recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associated death domain) qui clive la procaspase-8 en caspase-8. La caspase-8 ainsi formée active la caspase-3 mettant ainsi en branle le processus d'apoptose (Figure 7) (Ashkenazi and Dixit, 1998).

La voie extrinsèque de l'apoptose la mieux caractérisée dans la physiopathologie glaucomateuse est celle de la signalisation TNF $\alpha$ . Il est en l'occurrence montré chez un modèle de glaucome que la suppression du gène de TNFR2 ou la neutralisation du TNF $\alpha$  à l'aide d'un anticorps augmente la survie des CGR (Nakazawa et al., 2006). L'injection chez des rats oculohypertensifs d'éta nercept, un agent pharmacologique contre TNF $\alpha$  promeut la survie des CGR (Roh et al., 2012; Lebrun-Julien et al., 2009). Le TNF $\alpha$  existe sous deux formes aux rôles physiologiques distincts : la forme transmembranaire, et la forme soluble issue du clivage protéolytique du précédent. Il est démontré que dans le cas du glaucome c'est la forme soluble qui est responsable des effets toxiques de TNF $\alpha$  tandis que la forme membranaire exerce au contraire un effet bénéfique sur la survie de CGR (Mac Nair et al., 2014; Cueva Vargas et al., 2015).



**Figure 7. Voies de signalisation proapoptotique de TNF $\alpha$  et Fas.** Dans la voie extrinsèque de l'apoptose, la fixation de TNF $\alpha$  et Fas à leur récepteur respectif, conduit par le biais de FADD à la conversion de la procaspase 8 en caspase 8. Ceci déclenche le clivage et l'activation de la caspase effectrice caspase -3. L'activation des récepteurs TNFR et Fas peut, grâce à la caspase-8, induire la transactivation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Ceci se fait par le clivage de Bid par la caspase-8 afin de produire une forme tronquée de la protéine ou tBid. Cette dernière stimule Bax provoquant ainsi la libération par les mitochondries du cytochrome c et de Smac lesquels iront induire l'activation de la caspase 3. Modifié de Roth and Reed (2002).

Notons que la caspase-8 représente un important carrefour de signalisation, car outre la voie extrinsèque, elle sert aussi d'intermédiaire à la transactivation de la voie intrinsèque de l'apoptose. En effet, une fois activée la caspase-8 clive également le facteur proapoptotique Bid pour produire la forme tronquée (tBid), qui est transloquée vers les mitochondries où elle activera Bax (Figure 6). On peut donc dire que la mort

cellulaire causée par les signalisations TNF $\alpha$  et FasL résulte finalement d'une interaction entre les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose.

Bien que des niveaux élevés de caspase-8, aient été décrits *in vivo* dans des modèles d'HTO (Huang et al., 2005a; Kim and Park, 2005), l'inactivation de la caspase-8 suite à la hausse toxique de TNF $\alpha$  n'améliore pour autant pas la survie des CGR (Tezel and Yang, 2004; Lebrun-Julien et al., 2009). Ceci indique que l'effet neurotoxique de TNF $\alpha$  se fait indépendamment de la caspase -8. Effectivement Cuevas Vargas et al., en utilisant des rats atteints d'HTO démontrent que l'effet neurotoxique de TNF $\alpha$  sur les CGR se fait par la surexpression des récepteurs AMPA perméables au Ca<sup>2+</sup>. La hausse de l'expression des récepteurs AMPA perméables au Ca<sup>2+</sup> promeut l'excitotoxicité causée par l'entrée massive de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule (Cueva Vargas et al., 2015). Deux faits saillants méritent d'être relevés de cette étude. Primo, il est montré que le TNF $\alpha$  déclenche la mort cellulaire suivant une voie non canonique, dépendante du Ca<sup>2+</sup>. Nous reviendrons ultérieurement sur quelques-uns des mécanismes médiateurs de la toxicité calcique. Secundo, l'étude de Cueva Vargas et al. établit pour la première fois dans le glaucome un lien mécanistique entre la réponse inflammatoire soit la production de TNF $\alpha$ , et l'excitotoxicité suite à l'activation des récepteurs AMPA perméables au Ca<sup>2+</sup>. Dans une étude ultérieure, Cueva Vargas et al. montrent que les cellules de Müller jouent un rôle clé dans la toxicité de TNF $\alpha$ . En effet, suite à l'induction de l'HTO il se produit dans ces cellules une surexpression de la phosphodiesterase de type 4 (convertisseur de l'AMPc en AMP), ce qui inhibe de la synthèse d'AMPc (Cueva Vargas et al., 2016). La baisse de l'AMPc en diminuant l'activation de PKA (protein kinase A) stimule le facteur

de transcription proinflammatoire NF- $\kappa$ B (Gerlo et al., 2011). Cette réponse déclenche la libération de TNF $\alpha$  par les cellules de Müller, ce qui au final provoque la mort des CGR.

#### **2.1.6.2. Axonopathie**

Les données cliniques et expérimentales montrent que la dégénérescence des axones des CGR précède celle du soma neuronal et constitue l'une des premières manifestations pathologiques du glaucome (Calkins, 2012; Howell et al., 2013). L'utilisation de souris glaucomateuses DBA/2J chez lesquelles les CGR expriment un gène rapporteur révèle que dans le nerf optique, la topographie de la perte axonale correspond remarquablement bien aux régions rétiniennes dépourvues de cellules ganglionnaires (Schlamp et al., 2006; Howell et al., 2007). Il semble donc que pour ces neurones, la perte des axones est solidaire de celle du soma. Curieusement, l'inactivation du gène du facteur proapoptotique *Bax* chez les souris DBA/2J, bien qu'elle augmente la survie du soma des CGR ne protège pas pour autant leur axone de la dégénérescence (Libby et al., 2005a). Réciproquement, l'insertion chez des rats glaucomateux de l'allèle *Wlds* (*Wallerian degeneration slow*) codant pour une protéine chimérique qui protège les axones contre les lésions dégénératives, augmente considérablement la survie des axones des CGR tandis que les somas continuent de dégénérer. Ces deux études démontrent élégamment que la perte axonale s'effectue suivant des mécanismes distincts de ceux du soma.

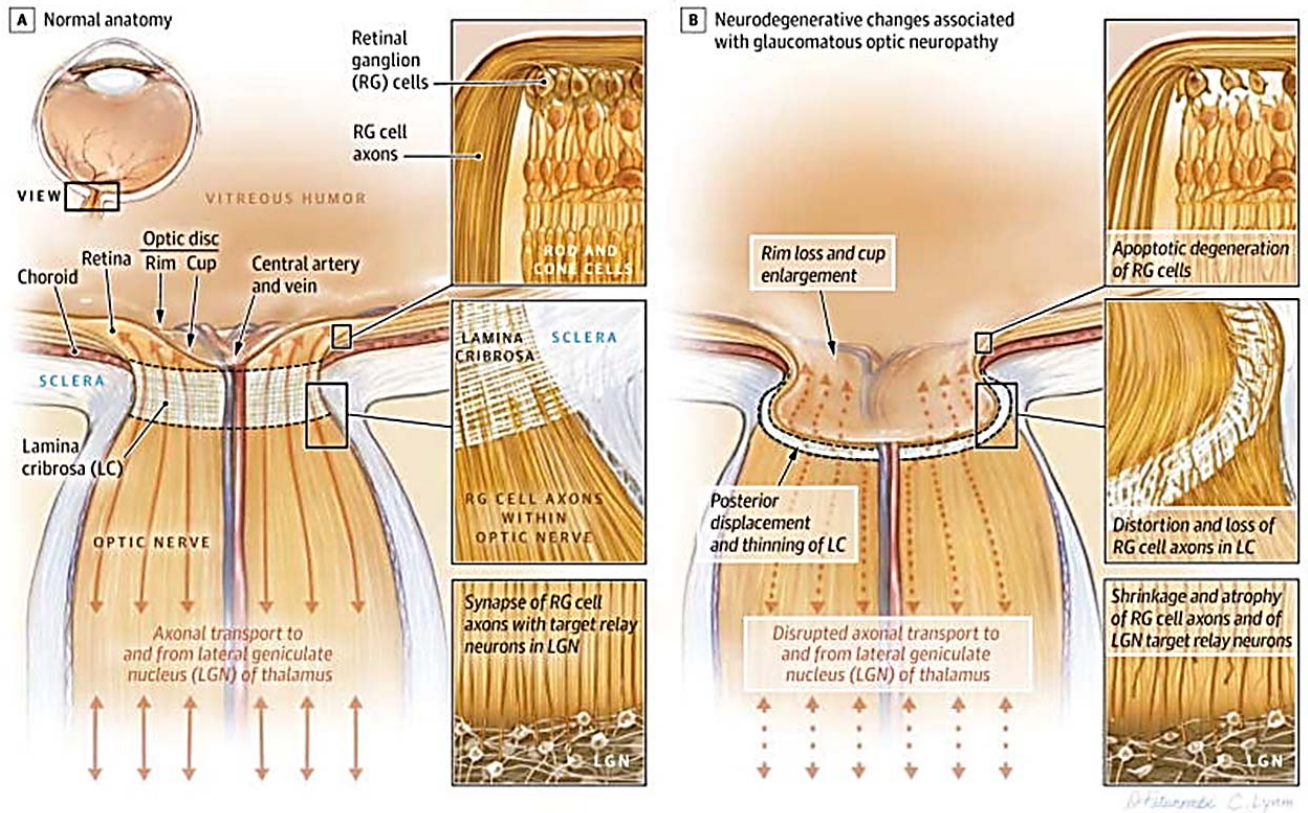
Quels sont donc les mécanismes à l'origine de la dégénérescence axonale ? Bien que les connaissances que nous avons à ce sujet demeurent encore partielles, des

enseignements utiles peuvent néanmoins être tirés de l'étude des changements survenant dans la tête du nerf optique.

La tête du nerf optique est la région anatomique où les axones des CGR convergent pour former le nerf optique. Cette région correspond à une zone de transition au cours de laquelle les axones originellement non myélinisés se transforment en structures myélinisées alors qu'elles traversent la lame criblée (Figure 8A). De nombreuses études montrent que la tête du nerf optique est le premier site atteint dans la neuropathie optique (Quigley et al., 1981; Schlamp et al., 2006; Howell et al., 2007; Johnson et al., 2007). Il a été proposé que le stress mécanique créé par l'HTO s'exercerait en majeure partie sur la tête du nerf optique qu'elle comprime contre les structures laminaires (Figure 8B) (Weinreb et al., 2014).

Selon le paradigme de lésion biomécanique du nerf optique, le stress généré par l'HTO dépolarise la membrane axoplasmique par ouverture des canaux sodiques sensibles à la pression. La dépolarisation active les canaux calciques voltage-dépendant tout en inversant l'activité des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  avec comme conséquence une hausse du niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. La hausse de la pression intraoculaire peut aussi directement provoquer l'ouverture des récepteurs TRPV1 (Transient Receptor Potential capsaïcine-sensitive Vanilloid Subunit 1) perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  (Sappington et al., 2009).



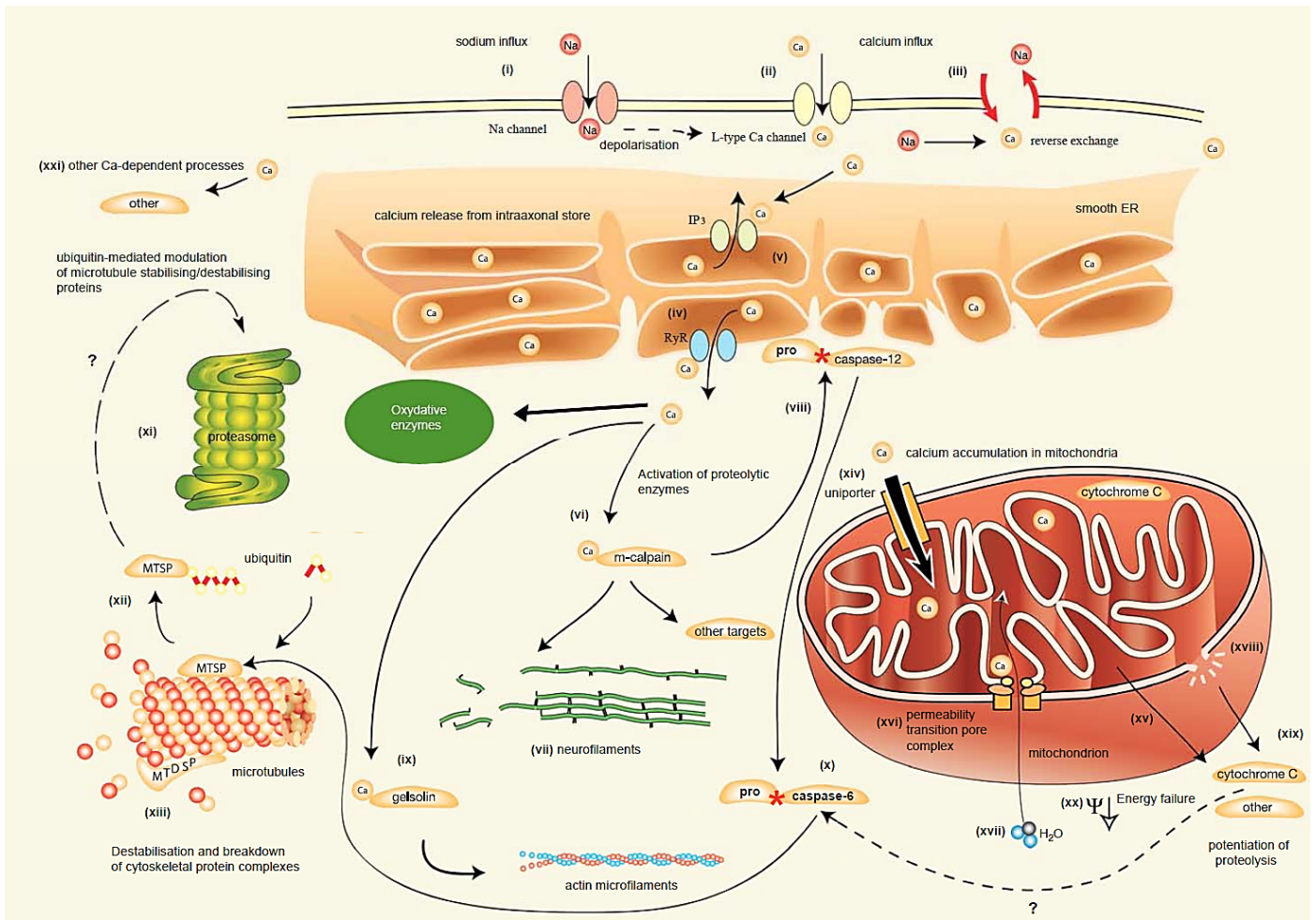


**Figure 8. Anatomie de la tête du nerf optique sain et glaucomateux.**

(A) La tête du nerf optique correspond à la région du globe oculaire où les axones des CGR émergent de la rétine au niveau du disque optique pour former le nerf optique. Le panneau supérieur illustre la région intrarétinienne des CGR qui inclut les dendrites, le soma et le segment intrarétinien de l'axone. Dans le panneau moyen est représenté le segment extrarétinien des axones situés dans le nerf optique pendant qu'ils traversent la lame criblée. Le panneau inférieur montre les terminaisons axonales des CGR faisant synapse avec les neurones du corps genouillé latéral. (B) Lors du glaucome, il y a une excavation du disque optique et un rétrécissement de son pourtour causé par la dégénérescence des axones dans la tête du nerf optique. Les panneaux supérieur, moyen et inférieur montrent respectivement la dégénérescence du compartiment intrarétinien des CGR, la distorsion et la perte des axones du nerf optique dans la lame criblée et l'atrophie des terminaisons axonales et de leurs relais synaptiques dans le corps genouillé latéral. Tiré de Weinreb et al. (2014).

L'afflux de calcium intracellulaire, active les récepteurs ryanodine et inositol triphosphate du réticulum endoplasmique dont l'ouverture provoque la sortie massive de  $\text{Ca}^{2+}$  de la lumière du réticulum vers le cytosol, ce qui amplifie la hausse initiale. Cette intrusion massive du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'axone est à l'origine d'une cascade d'événements aux effets aussi délétères suivant des mécanismes rappelant ceux de l'excitotoxicité (Figure 9).

Il y'a d'abord la stimulation des enzymes protéolytiques  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes telles que la m-calpaïne et la gelsoline qui dégraderont respectivement les neurofilaments et les filaments d'actine (Whitmore et al., 2005). La m-calpaïne une fois activée convertit aussi la procaspase 12 en caspase 12, laquelle active à son tour la caspase-6. Cette dernière pourra dégrader davantage le cytosquelette en détruisant les protéines de stabilisation des microtubules. Ensuite, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol axonal mène à son accumulation dans les mitochondries provoquant de graves dysfonctionnements de l'organite (Whitmore et al., 2005). On pourra citer par exemple la dépolarisation membranaire qui en affectant la phosphorylation oxydative diminue la synthèse de l'ATP et augmente la formation des radicaux libres (Whitmore et al., 2005). À cela s'ajoutent le gonflement puis la rupture des mitochondries, qui libèrent le cytochrome c déclenchant ainsi l'activation de caspase-3 (Whitmore et al., 2005). Ces effets sur les mitochondries sont d'autant plus dramatiques que la concentration des mitochondries est très forte dans le segment non myélinisé de la tête du nerf optique en raison des besoins énergétiques importants que requiert la conduction non saltatoire (Barron et al., 2004).



**Figure 9. Voies de dégénérescence  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendantes des axones des CGR.**

i-v) L'afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol axonal déclenche une pléthore de réactions aux effets nocifs. vi-xiii) le  $\text{Ca}^{2+}$  stimule les enzymes protéolytiques m-calpain et gelsoline qui dégradent le cytosquelette soit en lysant directement les filaments intermédiaires et les microfilaments, soit en activant la caspases-6 qui détruira les protéines de stabilisation des microtubules ; le  $\text{Ca}^{2+}$  active aussi les enzymes pro-oxydantes qui vont induire la formation de radicaux libres. xiv-xx) L'excès de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme axonal provoque une irruption de l'ion dans la mitochondrie causant ainsi la baisse de sa polarité membranaire ; ceci est combiné au gonflement de l'organite suite à l'entrée de l' $\text{H}_2\text{O}$  ce qui provoque la perforation de l'organite. Ces changements exacerbent le stress oxydatif par formation de radicaux libres et provoquent l'apoptose via la libération du cytochrome c. Modifié de Whitmore et al. (2005).

L'abondance de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'axone engendre finalement le stress oxydatif par stimulation d'enzymes pro-oxydantes génératrices de radicaux libres, parmi lesquels la synthase de l'oxyde nitreux (NO) et le NADPH oxydase (Crish and Calkins, 2011). Les données expérimentales révèlent qu'en prélude à la dégénérescence axonale l'HTO provoque une baisse du transport axonal antérograde (Crish et al., 2010) rapidement suivi par la réduction de son équivalent rétrograde (Salinas-Navarro et al., 2010; Vidal-Sanz et al., 2012). La baisse du transport actif peut s'expliquer par le dysfonctionnement des mitochondries qui ne fournissent plus l'énergie nécessaire à cet important processus cellulaire. En retour, le déficit du transport fait en sorte que les mitochondries défectueuses ne peuvent être transportées de manière rétrograde vers le soma pour y être recyclées. Inversement, les mitochondries saines ne peuvent non plus être acheminées de manière antérograde vers les régions distales pour combler le déficit local. La combinaison de ces deux effets crée un véritable cercle vicieux qui se solde par la destruction de l'axone.

Deux mécanismes non mutuellement exclusifs ont été proposés pour décrire le processus dégénératif lié aux axones des CGR. Il s'agit de la dégénérescence wallérienne (ou mort antérograde) et l'axonopathie distale (ou mort rétrograde).

#### **a. Dégénérescence wallérienne**

La dégénérescence wallérienne décrite pour la première fois par Augustus Waller, s'effectue lorsqu'il y a une lésion focale sur un axone. Ici, l'extrémité distale de l'axone dégénère suivant un pattern caractéristique avec accumulation de corpuscules denses et formation de varicosités (Waller, 1850). Le segment proximal lié au soma pour sa part

survit plus longtemps, et peut éventuellement se régénérer dans le cas du système nerveux périphérique (Gaudet et al., 2011). C'est ce type de dégénérescence qu'on rencontre dans le modèle d'axotomie du nerf optique. La nature focalisée des lésions observées dans la tête du nerf optique (où la compression provoquée par l'HTO est maximale) suggère l'existence d'une dégénérescence de type wallérienne. De surcroît dans le modèle DAB/2J d'HTO, la présence dans les axones du nerf optique de protubérances s'étendant depuis la tête du nerf optique jusqu'à aux colliculus supérieur est évocateur des varicosités axonales caractéristiques de la dégénérescence wallérienne.

#### **b. Axonopathie distale**

Les données expérimentales supportent aussi un mécanisme d'axonopathie distale qui en essence consiste en une dégénérescence lente et progressive de l'axone de son extrémité la plus distale jusqu'au corps cellulaire. Un argument en faveur de ce mécanisme provient de l'étude de Schlamp et al. menée chez les souris DAB/2J qui révèle que le marquage rétrograde des axones des CGR avec le fluorophore DiI fait apparaître une hausse progressive de la fluorescence suivant un gradient disto-proximal, ce qui indique que les extrémités les plus distales des axones sont altérées (Schlamp et al., 2006). Toujours chez le même modèle, les travaux de Chris et al., dévoilent que le transport antérograde et le nombre d'axones diminuent au fur et à mesure qu'on se rapproche de l'extrémité distale du nerf optique (Crish et al., 2010). Ces données expérimentales supportent donc un modèle de dégénérescence axonale initialisée au niveau de la terminaison synaptique dans le colliculus supérieur, qui remonte ensuite de proche en proche vers la rétine.

### **2.1.6.3. Dysfonctionnements dendritiques**

L'étude des anomalies dendritiques est longtemps restée le parent pauvre de la recherche sur le glaucome (Agostinone and Di Polo, 2015). On estimait alors, et à tort, que le soma et les dendrites des CGR ne forment qu'une seule entité et qu'il suffisait d'étudier le premier pour connaître le sort dévolu aux seconds. Le problème à vrai dire était surtout celui d'une limitation technique, car les outils d'imagerie disponibles jusqu'alors à l'instar de la tomographie par cohérence optique n'ont pas assez de résolution pour distinguer les changements se déroulant dans la couche des CCG (couche du soma des CGR) de ceux survenant dans la CPI (couche des dendrites des CGR). C'est pourquoi dans l'analyse de l'imagerie rétinienne ces deux couches étaient regroupées en une seule entité dont l'épaisseur diminue avec le glaucome (Drexler et al., 2001; Raza et al., 2011; Sriram et al., 2012). La mise au point de la tomographie par cohérence optique à domaine de fréquence qui permet l'acquisition d'images de très haute résolution autorise désormais l'étude des changements qu'encourt spécifiquement la CPI (Tan et al., 2009; Wang et al., 2009). C'est ainsi que cette technique dévoile que dans le glaucome, il y a une diminution de l'épaisseur de la CPI (de A Moura et al., 2012), révélant ainsi l'existence d'anomalies dendritiques. Cette observation concorde avec l'autopsie de rétines de patients glaucomateux faisant état d'un rétrécissement de l'arborisation dendritique des cellules ganglionnaires (Pavlidis et al., 2003).

Il se trouve qu'en réalité, les dendrites des cellules ganglionnaires sont des structures hautement dynamiques qui en cas de lésion subissent des changements morphologiques d'une complexité fascinante (Lindsey et al., 2015; Morquette et al., 2015; Morquette and Di Polo, 2008; Agostinone and Di Polo, 2015). Un large faisceau

d'évidences issu d'études sur modèles murin, félin et simien d'HTO démontre que le glaucome provoque une réduction du nombre, de la longueur et de la complexité des dendrites des CRG (Weber et al., 1998; Shou et al., 2003; Della Santina et al., 2013; Feng et al., 2013; Liu et al., 2014; Berry et al., 2015). Il a été rapporté que chez les sujets oculohypertensifs, les changements morphologiques des dendrites sont plus importants chez les CGR de type off (Della Santina et al., 2013; El-Danaf and Huberman, 2015). De manière remarquable, chez les cellules ganglionnaires glaucomateuses les anomalies dendritiques surviennent bien avant l'apparition des premiers signes de dégénérescence des somas et des axones (Weber et al., 1998; Shou et al., 2003; El-Danaf and Huberman, 2015). Face à cette observation, il a été proposé que la destruction de l'arborisation dendritique lors du glaucome se ferait par le truchement de mécanismes moléculaires spécifiques (Liu et al., 2011). Des études suggèrent justement que l'inactivation de la voie de signalisation mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) serait responsable de la pathologie dendritique étant donné que la réactivation de cette voie dans un modèle d'axotomie du nerf optique prévient l'atrophie des dendrites (Morquette et al., 2015).

Comme on pourrait s'y attendre, les dendrites sont aussi le théâtre de changement dans la connectivité synaptique des CGR suite au glaucome. Il est en effet montré que la rétraction dendritique est corrélée à une perte par les cellules ganglionnaires du marqueur post-synaptique PSD-95 (Della Santina et al., 2013; Berry et al., 2015). Paradoxalement, la diminution post-lésionnelle de l'arborisation dendritique conduit plutôt à une augmentation de la réponse des CGR aux stimuli lumineux (Morquette et al., 2015). En accord avec cette observation, Ward et al. montrent que l'induction de l'HTO augmente l'excitabilité des CGR par la suractivation des canaux calciques TRPV1 (Ward et al.,

2014). En outre, la hausse de la pression intraoculaire engendre une surexpression du marqueur présynaptique synaptophysine (Park et al., 2014), suggérant ainsi une importante activité présynaptique. Tout se passe comme-ci l'excitation des CGR est accrue afin de compenser l'atrophie dendritique post-lésionnelle. Le problème c'est que cette hyperexcitabilité est potentiellement toxique, car elle peut provoquer une activation prolongée des récepteurs NMDA et AMPA et créer un afflux massif de calcium dans le neurone avec tous les effets délétères décrits plus haut.

Pour terminer cette partie de notre discussion relative au glaucome, nous pouvons dire que la perte des CGR est l'aboutissement de différents processus pathologiques survenant de manière compartimentée dans la cellule (Whitmore et al., 2005). Ces changements surviennent en parallèle et agissent de concert pour aboutir à la mort du neurone suivant une chronologie précise. Les dendrites sont les premiers à s'atrophier, ensuite vient la dégénérescence axonale et enfin le corps cellulaire se rétrécit et meurt par apoptose. Sous cet aspect, le glaucome ressemble à une autre maladie neurodégénérative caractérisée par des changements spécifiques dans les compartiments somatodendritiques et axonaux. Il s'agit en l'occurrence de la MA sur lequel nous allons nous appesantir dans la seconde partie de ce chapitre.



## **2.2. Maladie d'Alzheimer : mémoire d'une démence**

### **2.2.1. Définition et épidémiologie**

La MA est une démence neurodégénérative décrite pour la première fois par Aloys Alzheimer en 1907 et caractérisée par la présence dans le cerveau de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires auxquelles s'ajoutent la dystrophie des neurones, la perte neuronale, l'astrogliose et des troubles vasculaires. La MA représente la principale cause de démence avec 50 à 70 % des cas recensés (Winblad et al., 2016). Parmi les victimes, 95 % manifestent la forme sporadique de la maladie qui survient après l'âge de 65 ans tandis que les 5 % restants correspondent à la forme familiale, plus agressive et qui apparaît avant l'âge de 60 ans (Winblad et al., 2016). Selon une étude menée aux États-Unis sur les personnes du troisième âge, les décès liés à la MA représentent environ 32 % de ceux enregistrés en 2010, une proportion qui devrait atteindre 43 % d'ici 2050 (Weuve et al., 2014). Toujours aux États-Unis, il est estimé que le risque de décès liés à la MA est de 37 % chez les personnes âgées (James et al., 2014). À ce tableau sinistre s'ajoute le fait que la prévalence de la maladie est en croissance permanente en raison du vieillissement général de la population mondiale. En 2015, près de 47 millions de personnes à travers le monde souffraient de démence, et d'après les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé, ce chiffre devrait atteindre 75 millions en 2030 et 131 millions en 2050 (Prince et al., 2015). Une fois que la MA s'installe, le nombre médian d'années de survie chez les personnes âgées de 65 ans et plus se situe entre 3 et 8 années (Larson et al., 2004; Fitzpatrick et al., 2005; Ganguli et al., 2005; Helzner et al., 2008). Ces chiffres alarmants font de la MA une véritable calamité en terme de santé des populations.

### **2.2.2. Manifestations cliniques et facteurs de risques**

Le premier signe clinique indicateur de troubles démentiel est la perte de la mémoire. Cette perte mnésique qui apparaît d'abord dans le cadre de troubles cognitifs légers est décelable lors d'examens neuropsychologiques dont le MMSE (mini-mental status examination) ou du MoCa (Montréal Cognitive Assessment). En moyenne un score inférieur ou égal à 23/30 au MMSE ou 16/30 au MoCa est considéré comme typique de la MA (Nasreddine et al., 2005). La maladie progresse ensuite avec l'aggravation des troubles de mémoire qui se manifestent désormais dans le cadre d'un syndrome cognitif incluant la confusion, la dysphasie, les changements d'humeur, la perte des fonctions exécutives, et les troubles du comportement. À ce stade le sujet perd toute son autonomie et dépend entièrement de son entourage pour l'exécution des tâches quotidiennes. Dans les phases terminales de la maladie, les malades devenus grabataires souffrent d'incontinence, et la mort est souvent le résultat d'autres comorbidités, plus fréquemment la pneumonie.

Étant donné que la démence peut avoir plusieurs autres étiologies incluant la amyloïdopathie vasculaire, le diabète, la maladie de Creutzfeldt–Jakob, et la démence fronto-temporelle, la seule façon de diagnostiquer formellement la MA reste encore l'autopsie du cerveau à la recherche des marqueurs pathognomoniques de la maladie que sont les plaques séniles et les enchevêtrements neurofibrillaires. L'analyse histopathologique de cerveaux alzheimeriens révèle également une atrophie de l'hippocampe, un rétrécissement des circonvolutions corticales, combinés à une hypertrophie ventriculaire, tous des signes indicateurs d'une importante dégénérescence neuronale.

L'âge est le plus important facteur de risque de la MA dont les formes sporadiques ne se rencontrent qu'à partir de 65 ans. Dans ce groupe d'âge, la prévalence de la maladie augmente avec le vieillissement pour atteindre environ 25 % chez les personnes âgées de 85 ans et plus. Un autre facteur de risque, génétique cette fois, est le polymorphisme pour le gène APOE (Apoenzyme E). Les sujets homozygotes pour l'isoforme APOE4 ont de 50 à 60 % plus de risque de développer la MA, tandis que l'hétérozygotie pour l'APOE3 ou APOE4 représente un risque de 20 à 30 % (Genin et al., 2011). Il existe d'autres facteurs de risques de la MA liés au style de vie parmi lesquels les troubles cardiovasculaires, le diabète, l'obésité, le manque d'activité physique, et le tabagisme (Norton et al., 2014).

### **2.2.3. Modèles animaux de la maladie d'Alzheimer**

Compte tenu du rôle crucial de tau et de l'A $\beta$  dans la pathophysiologie de la MA, tous les modèles précliniques de la maladie sont basés sur l'insertion dans le génome murin de gènes codant pour les mutations humaines de ces deux protéines. Un modèle de MA pour être considéré comme valable doit être capable de répliquer, autant que faire se peut, le phénotype histologique et comportemental de la maladie. Ceci inclut la formation des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires, et les troubles cognitifs.

#### **2.2.3.1. Modèles basés sur la pathologie amyloïde**

Le développement de modèles génétiques de la MA pris de l'essor lorsqu'il fut réalisé que toutes les formes héréditaires de la pathologie résultent de mutations dans la voie de synthèse de l'A $\beta$ . Une stratégie rapidement adoptée fut de reproduire ces

mutations chez des souris transgéniques, afin de simuler la pathologie Alzheimer. Jusqu'à nos jours, la majorité des modèles expérimentaux reposent toujours sur l'induction d'une  $\beta$ -amyloïdopathie cérébrale. Le premier modèle ainsi produit fut le modèle hAPP qui exprime l'APP humaine portant la mutation suédoise (APP<sup>swe</sup>) et placée sous le contrôle du promoteur neuronal Thy-1 (Hsiao et al., 1996). D'autres lignées hAPP furent par la suite créées par introduction de l'APP humaine portant cette fois les mutations hollandaise (E693Q) (Herzig et al., 2004), londonienne (V717I) (Moechars et al., 1999), ou arctique (E693G) (Knobloch et al., 2007) combinées ou non à la mutation suédoise. En fonction des modèles utilisés, les plaques séniles apparaissent dans le parenchyme cérébral entre le 9<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> mois d'âge.

Bien que les plaques séniles et les déficits cognitifs soient présents chez les souris hAPP, il n'est pas possible d'isoler les effets liés à l'activation de la voie amyloïdogénique de ceux provenant de la voie non amyloïdogénique. C'est afin de résoudre cette limite que les modèles doubles transgéniques APP/PS1 ont été mis au point. Ici les souris expriment à la fois l'APP<sup>swe</sup> et la PS1 humaine ayant les mutations  $\Delta$ E9, L166P ou A246E (Borchelt et al., 1997; Jankowsky et al., 2001; Radde et al., 2006). La présence de la PS1 mutée stimule la voie de clivage amyloïdogénique de l'APP<sup>swe</sup> ce qui promeut la surexpression de l'A $\beta$ <sub>42</sub>. Chez ces animaux transgéniques, les plaques et les troubles comportementaux sont visibles dès le 6<sup>ème</sup> mois. Un autre modèle encore plus agressif est le modèle quintuple transgénique (5xTg) dans lequel les souris co-expriment 5 mutations associées à la forme héréditaire de la MA. Il s'agit en l'occurrence pour l'APP des mutations suédoise, londonienne et de Floride (I716V) et pour la PS1 des

mutations M146L et L286V. Les souris 5xTg développent des plaques séniles à partir du 2<sup>ème</sup> mois associé à de considérables déficits comportementaux visibles dès le 4<sup>ème</sup> mois.

### **2.2.3.2. Modèles basés sur l'amyloïdopathie et la tauopathie**

Les modèles que nous venons de décrire ne développent pas de pathologie de tau, alors que ceci représente une caractéristique cardinale de la MA. Certes il existe des animaux qui surexpriment tau avec d'importants troubles cognitifs, en l'occurrence les modèles tau P301L et tau P301S. Cependant, en l'absence de pathologie amyloïde ces animaux ne représentent pas des modèles de MA, mais plutôt de tauopathie pure. C'est dans le souci de modéliser à la fois l'amyloïdopathie et la tauopathie dans le cerveau que le modèle triple transgénique (3xTg) a été développé par Oddo et al. Ce modèle est produit par co-expression des mutations dans les transgènes APP (swe), PS1 (M146L) et tau (P301L) le tout placé sous le contrôle du promoteur Thy-1. Chez ces souris, l'accumulation de l'A $\beta$  commence dans le cortex cérébral dès le 3<sup>ème</sup> mois et les plaques séniles sont visibles à partir du 6<sup>ème</sup> mois. Tau quant à lui commence à s'agréger dans l'hippocampe à partir du 6<sup>ème</sup> mois avant de se propager au cortex alors que les enchevêtrements apparaissent dans l'hippocampe entre le 12<sup>ème</sup> -15<sup>ème</sup> mois (Oddo et al., 2003a; Oddo et al., 2003b).

La réussite d'un modèle animal de la MA dépend surtout du choix promoteur utilisé pour contrôler l'expression du (des) transgène (s) dans le cerveau. Le promoteur de PDGF-B (Platelet-Derived Growth Factor B-chain) fut l'un des premiers à être utilisé à cet effet, car il permet une expression constitutive du gène à travers le cerveau. Le promoteur de la protéine prion est aussi fréquemment utilisé pour réguler l'expression

cérébrale d'un gène, en plus il offre l'avantage de stimuler fortement l'expression génique, et ce jusqu'à 15 fois le niveau basal. Cependant, ces deux promoteurs présentent l'inconvénient d'être aussi exprimés, quoique faiblement, dans les cellules non neuronales incluant les cellules gliales, cardiomyocytes, thymocytes, ce qui limite leur sélectivité pour les neurones. Le promoteur le plus efficace jusqu'à présent est le promoteur Thy-1 qui est spécifique aux neurones et qui stimule une forte expression du gène placé en aval. Ce promoteur offre aussi l'unique qualité de n'être activé qu'au 7<sup>ème</sup> jour postnatal, ce qui permet de prévenir tout effet négatif du transgène durant le développement (Hall and Roberson, 2012).

#### **2.2.4. Mécanismes pathophysiologiques de la MA**

Les progrès réalisés ces dernières décennies dans la compréhension de la MA ont permis à la communauté scientifique d'arriver à un consensus, c'est que les changements pathologiques à l'origine de la maladie surviennent plusieurs années avant l'apparition des premiers troubles cliniques. Malheureusement, on ignore pour l'instant les éléments déclencheurs de ces anomalies, ce qui explique pourquoi il n'existe actuellement aucun remède contre l'affection. Néanmoins, une première hypothèse formulée afin d'expliquer la physiopathologie de la MA fut celle de la cascade amyloïde.

##### **2.2.4.1. Hypothèse de la cascade amyloïde**

L'hypothèse de la cascade amyloïde stipule que c'est la hausse du niveau d'A $\beta$  qui serait à l'origine de la pathologie alzheimerienne. D'après cette hypothèse, l'accumulation d'A $\beta$  altère la transmission synaptique, provoque l'hyperphosphorylation

et l'accumulation pathologique de tau, déclenche la réponse inflammatoire et le stress oxydatif ce qui mène ultimement à la mort neuronale (Hardy et al., 1998; Hardy and Selkoe, 2002). En d'autres termes, d'après ce modèle tous les dysfonctionnements de tau observés dans la MA surviennent en aval de ceux de l'A $\beta$ .

Un argument en faveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde est le fait que les formes familiales de la MA sont toutes associées à des anomalies génétiques dans la voie de synthèse de l'A $\beta$  dont les mutations APP, PS1 et PS2 (Citron et al., 1992; De Strooper et al., 1998; Tanzi and Bertram, 2005; Shimojo et al., 2007). À l'inverse aucune mutation de tau n'a été identifiée jusqu'ici chez les patients atteints de la MA. Bien au contraire, lorsque des mutations de tau existent dans le cadre d'autres maladies comme les démences fronto-temporales on observe la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires, mais pas de plaques amyloïdes. Ces observations suggèrent donc que des anomalies dans le métabolisme d'A $\beta$  sont suffisantes pour conduire à l'accumulation de tau dans le cerveau humain, alors que la réciproque n'est pas vraie.

Plusieurs études sur modèles animaux de la MA semblent conforter l'hypothèse de la cascade amyloïde. Chez les souris 3xTg, l'accumulation de l'A $\beta$  précède celle de tau (Oddo et al., 2003a) tandis que la réduction du niveau d'A $\beta$  chez ces derniers par immunothérapie, conduit à l'élimination des agrégats de tau (Oddo et al., 2004). Il semble donc que lors de la démence, la pathologie amyloïde survient avant la tauopathie. De plus, la délétion de tau chez des souris surexprimant la forme humaine et mutante de l'APP prévient les troubles cognitifs indiquant ainsi que tau est placé en aval des effets toxiques de l'A $\beta$  (Palop et al., 2007; Roberson et al., 2007).

L'hypothèse de la cascade amyloïde présente néanmoins de nombreuses failles qu'il faut soulever. Tout d'abord, il est montré que dans le cerveau l'agrégation respective de tau et de l'A $\beta$  se fait dans des régions différentes du cerveau et suivant des séquences distinctes (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002); ceci indique que les processus qui président à l'agglomération de ces protéines empruntent des chemins indépendants. En outre l'analyse du cerveau de sujets humain montre qu'une importante accumulation d'A $\beta$  peut avoir lieu sans pour autant causer de troubles cognitifs notables ; ce qui prouve que la seule formation de dépôts amyloïdes ne suffit pas à produire une démence (Aizenstein et al., 2008a; Villemagne et al., 2011). De plus, contrairement à tau dont le niveau est fortement corrélé aux déficits cognitifs, la relation entre l'expression de l'A $\beta$  et les symptômes cognitifs est plus faible (Herrup, 2015). Enfin, bien que les souris surexprimant l'APP et/ou la PS1 développent des plaques séniles et des troubles cognitifs ils ne forment cependant pas d'enchevêtrements neurofibrillaires ; preuve que l'existence d'inclusions d'A $\beta$  n'implique pas nécessairement l'agrégation de tau (Trinchese et al., 2004; Prut et al., 2007). Enfin la plus importante réfutation de la cascade amyloïde découle des essais cliniques au cours desquels plusieurs agents thérapeutiques visant à l'élimination de l'A $\beta$  se sont tous soldés par des échecs cuisants. Ces agents incluent, les inhibiteurs de la  $\gamma$ -sécrétase, les anticorps anti-A $\beta$ , les antiagrégants d'A $\beta$  (Karran and De Strooper, 2016).

Ces contre-arguments ne veulent pas pour autant dire qu'il faille rejeter complètement l'idée d'une contribution importante de l'A $\beta$  à la pathophysiologie de la MA. Un schéma plus conforme aux données cliniques et expérimentales est celle d'une cascade d'événements où l'A $\beta$  et tau agissent indépendamment, mais aussi s'influencent



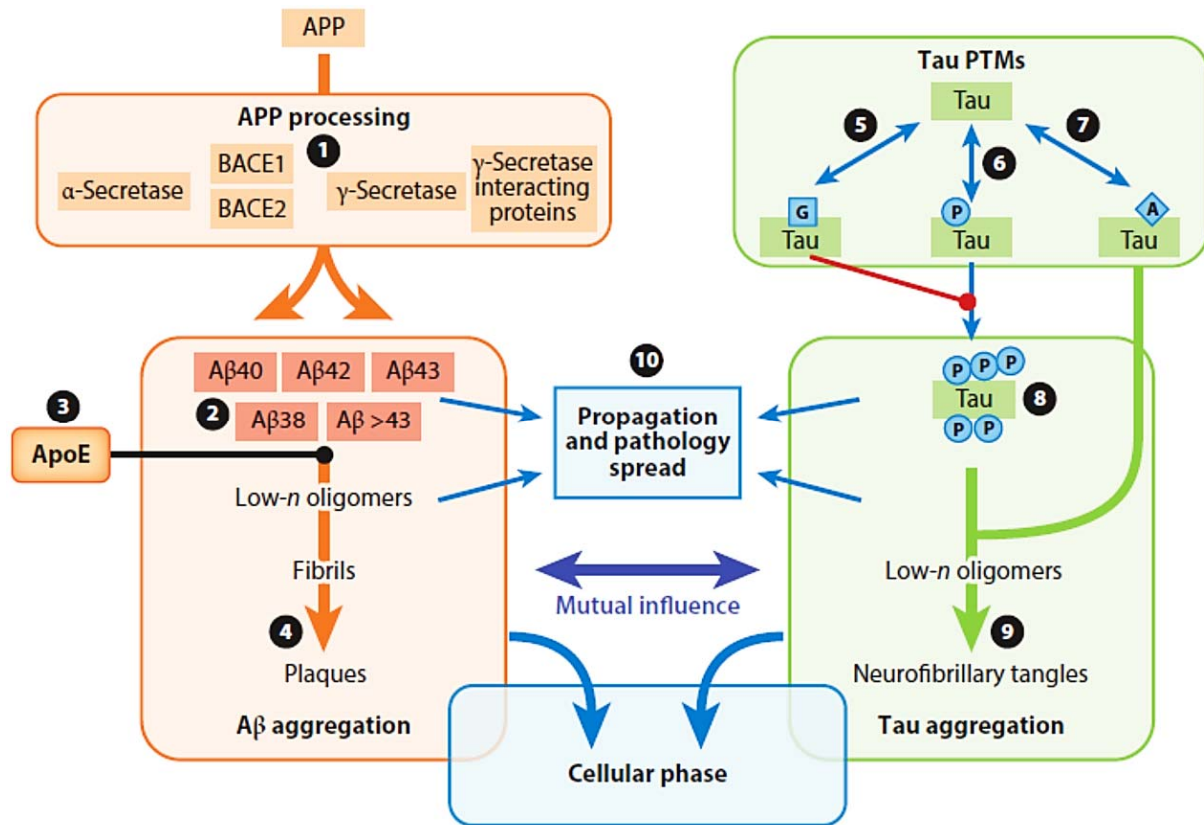
mutuellement, pour générer les changements neurotoxiques. Selon l'hypothèse biphasique récemment proposée, les troubles survenant dans la maladie opèrent en deux phases. La pathologie est amorcée durant la phase biochimique, caractérisée par des changements moléculaires des protéines tau et A $\beta$ . Ensuite la maladie progresse vers la phase cellulaire au cours de laquelle la neurotoxicité causée par les anomalies biochimiques devient apparente et provoque le syndrome démentiel (Figure 10) (De Strooper and Karran, 2016).

#### **2.2.4.2. La phase biochimique de la maladie d'Alzheimer**

Le processus pathologique de la MA est amorcé par l'apparition d'anomalies biochimiques de tau et A $\beta$  qui conduisent à leur dysfonctionnement. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, l'altération de tau résulte de changements post-traductionnels (phosphorylation, clivage etc.) qui promeuvent son accumulation dans la cellule. De même, la pathologie  $\beta$ -amyloïde est la due à des déséquilibres dans le métabolisme de l'APP qui promeuvent la surproduction dans le parenchyme cérébral de peptides A $\beta$  à forte propension à l'auto-assemblage.

Toutefois, ces altérations protéiques ne doivent pas être considérées comme inéluctables, puisque le cerveau peut continuer de fonctionner dans ces conditions pendant plusieurs années. C'est seulement quand les différents mécanismes de contrôle de la protéostasie sont incapables de corriger les changements de conformation et de prévenir la formation d'inclusions protéiques que les anomalies de tau et d'A $\beta$  deviennent véritablement problématiques. Lorsque c'est le cas, les modifications structurelles que subissent tau et A $\beta$  ainsi que leur oligomérisation/agrégation confèrent à ces derniers, par

perte ou gain de fonction, des propriétés toxiques (décrites dans le chapitre précédent) dont les effets cumulatifs mènent à la phase cellulaire de la MA (Figure 10).



**Figure 10. Hypothèse de la phase biochimique et cellulaire de la MA.** Selon l'hypothèse biphasique de la MA, la pathologie est amorcée durant la phase biochimique de la maladie au cours de laquelle les molécules d'Aβ et de tau subissent des altérations structurales et fonctionnelles. (1) L'hyperactivation de la voie amyloïdogénique provoque une accumulation de différentes espèces d'Aβ à toxicité variable. (2-4) Ces isoformes d'Aβ s'accumulent dans le parenchyme pour former des oligomères puis des plaques séniles tandis que leur clairance est influencée par le polymorphisme pour l'ApoE. (5-7) La phosphorylation et l'acétylation de tau provoquent son accumulation dans le cytoplasme alors que la glycosylation l'inhibe. (8-9) L'agrégation de tau promeut la formation d'oligomères puis de fibrilles de tau. (10) Les inclusions de tau et d'Aβ se propagent dans le cerveau et déclenchent des effets cytotoxiques suivant des voies parallèles tout en se renforçant mutuellement. Tous ces changements engendrent des troubles fonctionnels résultant en la phase cellulaire de la MA. Tiré de Sala Frigerio and De Strooper (2016).

### **2.2.4.3. La phase cellulaire de la maladie d'Alzheimer**

La neuropathologie proprement dite se déroule durant la phase cellulaire de la MA. Cette phase résulte d'une part des effets nocifs que tau et l'A $\beta$  exercent directement sur la transmission synaptique. D'autre part l'amoncellement de ces deux protéines dans le cerveau provoque indirectement la mort neuronale notamment par le biais de la gliose réactive à l'origine de la neuroinflammation et du stress oxydatif.

#### **a. Perturbations de la transmission synaptique**

L'une des premières manifestations pathologiques de la MA est l'altération de la transmission synaptique (Jang and Chung, 2016). Il est notamment montré chez les modèles APP/PS1 et 3xTg que la hausse de l'expression de l'A $\beta$  induit des altérations dans la morphologie et le fonctionnement des synapses (Selkoe, 2002; Coleman and Yao, 2003; Oddo et al., 2003b). L'A $\beta$  provoque ces effets en réduisant d'une part l'activité synaptique excitatrice par le moyen de l'internalisation des récepteurs glutamatergiques (Snyder et al., 2005; Hsieh et al., 2006) et d'autre part en facilitant la DLT par le biais de l'activation de la sous-unité NR2A des récepteurs NMDA péri ou extrasynaptiques (Liu et al., 2004). La combinaison de ces réponses conduit à la baisse de la transmission synaptique et à la baisse du nombre d'épines dendritiques chez les neurones en question.

Il est montré que l'effet synaptotoxique de l'A $\beta$  se fait par le biais de Fyn, étant donné que sa suppression chez des souris exprimant la mutation suédoise de l'APP (hAPP), permet de prévenir les troubles cognitifs (Chin et al., 2005). De manière intéressante Fyn interagit aussi avec le domaine de projection de tau. En d'autres termes Fyn fait le lien entre le peptide A $\beta$  extracellulaire et la protéine tau intracellulaire. C'est

dans cette perspective qu'Ittner et al., démontrent que tau fait office de médiateur de l'effet synaptotoxique de l'A $\beta$  en assurant le ciblage de Fyn vers les dendrites où ils pourront phosphoryler la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA. Cette phosphorylation non seulement favorise l'activation des récepteurs NMDA, mais aussi promeut leur interaction avec la protéine d'échafaudage PSD-95 de la densité post-synaptique. Ces effets augmentent la perméabilité des récepteurs au Ca<sup>2+</sup> suite à l'exposition à l'A $\beta$  ce qui promeut l'excitotoxicité (Ittner et al., 2010).

Tau peut aussi exercer des effets synaptotoxiques directement sur les neurones. La surexpression de tau dans des lignées de culture cellulaire engendre une baisse du nombre d'épines dendritiques ainsi qu'une réduction de l'expression des marqueurs pré et postsynaptiques (Thies and Mandelkow, 2007). Par ailleurs les souris transgéniques qui surexpriment tau présentent une diminution de l'activité électrique spontanée du réseau néocortical (Menkes-Caspi et al., 2015).

Vu le rôle primordial que joue la plasticité synaptique dans le processus de stockage et de consolidation des souvenirs dans l'hippocampe (Neves et al., 2008), il n'est pas surprenant que l'altération de la transmission synaptique se fasse très tôt ressentir dans cette région du cerveau (Oddo et al., 2003b; Palop et al., 2007). L'existence de ces perturbations synaptiques dans l'hippocampe permet donc de comprendre pourquoi les troubles de mémoire constituent la toute première manifestation clinique de la maladie.

Sur un autre plan, les crises épileptiques fréquemment rencontrées chez les patients souffrant de la variante génétique de la MA (Noebels, 2011), s'expliquent désormais lorsqu'on prend en compte les troubles de la plasticité synaptique décrits chez

les modèles animaux. En effet dans un réseau neuronal donné, l'altération de la transmission synaptique provoque un déséquilibre entre activités excitatrices et inhibitrices avec comme risque l'irruption de décharges électriques erratiques à caractère épileptique. C'est en l'occurrence ce qui est observé dans l'hippocampe et le néocortex des souris transgéniques, lorsqu'on effectue des enregistrements de l'activité corticale par électroencéphalographie (Palop et al., 2007; Minkeviciene et al., 2009). Sachant que les crises épileptiques en créant des décharges électriques incontrôlées causent la mort des neurones par excitotoxicité, on réalise combien leur présence dans les formes familiales augmente considérablement la sévérité de la MA.

#### **b. La gliose réactive**

La gliose réactive est une importante composante de la phase cellulaire de la MA. Elle résulte de l'activation des astrocytes (astrogliose) et des microglies (microgliose) par les agrégats d'A $\beta$ .

L'astrogliose qui a été identifiée par Aloys Alzheimer comme étant une des caractéristiques de la pathologie est marquée par l'hypertrophie et la prolifération des astrocytes, qui se mettent à surexprimer les filaments intermédiaires GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), vimentine et nestine. L'activation chronique des astrocytes provoque aussi des altérations dans les différents systèmes de contrôle de l'homéostasie extracellulaire. Parmi celles-ci on peut citer la diminution de l'expression de GLAST et de la glutamine synthétase, deux protéines requises respectivement pour l'internalisation et le recyclage du glutamate (Robel and Sontheimer, 2016). À cela s'ajoute la baisse du transporteur de GABA, de l'aquaporine-4, et de Kir4.1 qui est le canal de clairance du

potassium extracellulaire (Robel and Sontheimer, 2016). La perte de l'homéostasie extracellulaire consécutive à l'astrogliose résulte en des troubles de l'excitabilité et de la conductibilité neuronale. Une autre conséquence de l'hypertrophie astrocytaire est l'activation de la réponse inflammatoire au cours de laquelle les astrocytes libèrent des cytokines pro-inflammatoires dans le parenchyme cérébral, comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ .

Cependant la sécrétion des agents pro-inflammatoire se fait surtout en réponse à la l'activation des microglies, les véritables chefs d'orchestre de la réponse neuroinflammatoire. Une fois rentrées en contact avec les agrégats d'A $\beta$  ces cellules changent de phénotype, et de ramifiées deviennent amiboïdes. Les microglies ainsi activées produisent des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) et des chimiokines (CCL3, CCL4, CXCL2) qui à leur tour vont activer les autres microglies et astrocytes environnants et les attirer autour des plaques séniles ; au même moment la libération prolongée des cytokines induira l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose dans les neurones avoisinants (Spangenberg and Green, 2016). Des différentes cytokines libérées par les microglies, la plus proéminente est l'IL-1 $\beta$ . En effet l'analyse de cerveau de patients et de modèles expérimentaux de la MA montre qu'il y a une forte expression d'IL-1 $\beta$  dans les cellules microgliales entourant les plaques séniles (Griffin et al., 1989; Simard et al., 2006). De plus, de fortes concentrations d'IL-1 $\beta$  ont été mesurées dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de démence (Blum-Degen et al., 1995).

Une fois les microglies activées, elles phagocytent les agrégats d'A $\beta$  (Simard et al., 2006). Cependant une fois arrivés dans le cytoplasme, ces agrégats résistent à la dégradation enzymatique et provoquent au contraire la rupture des lysosomes et la libération du contenu lysosomal dans le cytosol parmi lesquels la protéase cathepsine B.

Cette dernière active l'inflammasome, un complexe multiprotéique, qui en stimulant la caspase-1, catalyse le clivage de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  (Halle et al., 2008; Masters and O'Neill, 2011; Saresella et al., 2016). L'activation de l'inflammasome permet donc d'expliquer pourquoi l'accumulation de l'A $\beta$  cause la sécrétion prépondérante de l'IL-1 $\beta$  par les microglies. Il est par ailleurs prouvé que la hausse A $\beta$ -dépendante de l'expression de TNF $\alpha$  et de l'ARNm des chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL2 se fait par le biais de la voie de signalisation inflammasome/IL-1 $\beta$  (Halle et al., 2008).

Tau contribue aussi à l'activation des microglies puisque les sujets surexprimant tau manifestent une nette activation microgliale laquelle précède la formation des enchevêtrements neurofibrillaires (Yoshiyama et al., 2007). En retour la microgliose réactive promeut l'hyperphosphorylation et l'agrégation de tau dans le compartiment somatodendritique démontrant ainsi que les microglies participent à la pathologie de tau (Bhaskar et al., 2010).

Le stress oxydatif est une composante non négligeable de la phase cellulaire de la MA. Outre son effet direct sur la génération de radicaux libres (voir chapitre précédent), l'A $\beta$  peut également provoquer le stress oxydatif par l'intermédiaire des cellules gliales. C'est ainsi que l'activation des microglies et des astrocytes par l'A $\beta$  en stimulant la NO-synthase induit la hausse de la production du NO (Weldon et al., 1998); le NO en oxydant différentes cibles moléculaires promeut la production de radicaux libres à l'origine du stress oxydatif. Des expériences *in vivo* confirment effectivement que la hausse A $\beta$ -dépendante du NO déclenche un considérable stress oxydatif dans le parenchyme cérébral avec comme conséquence la mort des neurones (Weldon et al., 1998). L'A $\beta$

stimule la synthèse de cette molécule pro-oxydante en activant le récepteur membranaire RAGE ou en induisant la signalisation d'IL-1 $\beta$  (Halle et al., 2008).

### **2.2.5. Propagation de la MA**

Des analyses post-mortem du cerveau de patients montrent que la formation des enchevêtrements neurofibrillaires suit une progression spatiale précise décrite par Heiko Braak et Eva Braak comme se résumant en 6 étapes, encore appelées stades de Braak. Dans les stades I et II, les enchevêtrements apparaissent dans le cortex transentrorhinal. De là ils se propagent vers le système limbique, où se trouve l'hippocampe, au cours des stades III et IV. Enfin, les stades finaux V et VI correspondent à la phase de dissémination des enchevêtrements au travers de l'isocortex (Braak and Braak, 1991).

L'A $\beta$  se propage aussi à travers le cerveau suivant une séquence distincte qui se décline en 5 phases. Dans la phase 1, les plaques séniles apparaissent d'abord dans le néocortex. La phase 2 marque la formation des plaques dans l'allocortex alors que dans la phase 3 ces plaques se disséminent jusqu'aux noyaux sous-corticaux. Les phases 4 et 5 correspondent respectivement à l'accumulation de l'A $\beta$  dans le tronc cérébral et le cervelet (Thal et al., 2002).

Le fait que l'agrégation de tau et d'A $\beta$  se fasse de manière séquentielle suggère l'existence d'un mécanisme de propagation de ces protéines à partir d'un foyer initial suivant un procédé similaire à celui des maladies à prions. Rappelons que dans les maladies à prion, la protéine prion subit un changement de conformation et acquiert des propriétés toxiques. Partant d'un foyer pathogène initial, les prions mal repliés se propagent à travers le cerveau en induisant la transformation de proche en proche des



prions normaux en conformères anormalement repliés et neurotoxiques. En outre, l'injection dans le cerveau sain de prions isolés d'extraits de cerveaux malades suffit à transformer les prions endogènes en formes pathologiques et à reproduire la maladie, démontrant ainsi le caractère infectieux des prionopathies (Soto, 2011).

Afin de déterminer si la propagation de l'A $\beta$  dans la MA s'effectue suivant un schéma similaire aux prions, des extraits de cerveaux provenant de patients ont été injectés dans l'hippocampe de souris et de rats transgéniques exprimant respectivement la forme sauvage et mutante du gène APP humain. Normalement ces rongeurs ne développent pas de plaques au cours de leur vie. Cependant, quelques mois après l'injection, des agrégats d'A $\beta$  furent observés dans l'hippocampe (Morales et al., 2012; Rosen et al., 2012). Plus important encore, les plaques furent également détectées dans le cortex cérébral des souris injectées, démontrant ainsi que la pathologie initialement présente dans l'hippocampe s'est disséminée vers le cortex (Morales et al., 2012). Cette propagation de la pathologie amyloïde nécessite la présence d'A $\beta$  anormalement repliés puisque la suppression ou la dénaturation des peptides A $\beta$  des homogénats de cerveau malades prévient la formation des plaques séniles dans le cerveau hôte (Meyer-Luehmann et al., 2006).

De manière similaire, l'injection dans l'hippocampe de souris exprimant la protéine tau humaine normale, d'extraits de cerveau de souris P301S contenant des enchevêtrements neurofibrillaires engendre la formation d'inclusions filamenteuses de tau. Ces inclusions se propagent ensuite vers les régions plus distales du site d'injection. Cet effet est spécifique à la protéine tau puisque son immunosuppression des extraits de cerveau prévient la formation des enchevêtrements (Clavaguera et al., 2009). Cette étude

fut par la suite confirmée le groupe de Kaye qui montre que l'administration dans l'hippocampe de souris sauvage, d'oligomères de tau isolés de cerveau de patients induit l'agrégation et la propagation de tau. Les souris ainsi traitées présentent une baisse drastique de la PLT dans l'hippocampe associée à de sévères troubles de la mémoire (Lasagna-Reeves et al., 2012). Les équipes de Hyman et Duff en utilisant des approches différentes, démontrent que l'expression dans le cortex entorhinal de tau P301L conduit après quelques mois à la formation d'agrégats non seulement dans le cortex entorhinal, mais aussi dans le gyrus denté et le cortex cingulaire (de Calignon et al., 2012; Liu et al., 2012). Ces travaux démontrent de manière élégante que la propagation de tau se fait de manière transsynaptique au travers de réseaux de neurones connectés. Il est intéressant de souligner que les agrégats de tau observés dans les régions du système limbique incluent la protéine tau murine endogène ; ce qui signifie que la présence de la protéine mutante suffit à induire le changement de conformation de la protéine normale, un autre phénomène évocateur des maladies à prion (de Calignon et al., 2012). Pour que la propagation puisse avoir lieu, la protéine tau doit nécessairement être libérée dans le milieu extracellulaire par des neurones puis internalisée par les neurones cibles. Des études montrent effectivement que dans les conditions physiologiques, tau est libéré dans le milieu extracellulaire suivant une voie de sécrétion non conventionnelle (Chai et al., 2012; Dujardin et al., 2014). Cette sécrétion de tau est exacerbée dans les conditions pathologiques, notamment en réponse à l'hyperphosphorylation et au clivage de la protéine, ou suite à des stress cellulaires tels que la privation en nutriment ou le dysfonctionnement lysosomal (Plouffe et al., 2012; Simon et al., 2012; Dujardin et al., 2014; Mohamed et al., 2014). Une fois sécrétée tau est endocytée par les neurones voisins

et transportée de manière rétrograde ou antérograde vers les cibles distales (Wu et al., 2013b). Ces observations expérimentales permettent donc de mieux comprendre comment s'effectue la propagation de tau entre les différents stages de Braak.

Pris dans l'ensemble ces études démontrent que dans la MA, la propagation de l'A $\beta$  et de tau se fait suivant des mécanismes similaires à ceux des maladies à prions. En revanche lorsqu'on accepte cette hypothèse une seconde question vient immédiatement à l'esprit : est-ce que la MA peut pour autant être apparentée à une prionopathie ? Pour répondre à cette question Hyman et ses collègues ont introduit la variante tau P301L dans le cortex entorhinal de souris knock-out pour la protéine tau endogène. En ce faisant, ils ont constaté que tau continue de se propager malgré l'absence de la protéine endogène (Wegmann et al., 2015). Ceci démontre que *stricto sensu* la MA et les tauopathies en général ne constituent pas des prionopathies puisque le développement d'une pathologie à prions nécessite que la protéine endogène soit présente afin de subir un changement de repliement. Néanmoins les mêmes auteurs ont observé que la toxicité normalement causée par l'accumulation de tau est réduite en absence de tau endogène (Wegmann et al., 2015). Ceci illustre donc que la pathologie de tau présente des mécanismes neurotoxiques communs à ceux des prionopathies tels que le stress oxydatif, la réponse inflammatoire, et la synaptotoxicité. Il serait intéressant de vérifier si ces observations expérimentales s'appliquent aussi à l'A $\beta$ .

## **2.3. Glaucome et maladie d'Alzheimer : une pathophysiologie commune ?**

Il existe un large faisceau d'indices qui suggère que le glaucome et la maladie d'Alzheimer présentent des mécanismes pathologiques communs. Nous allons passer en revue quelques-uns d'entre eux.

### **2.3.1. Pathologies alzheimeriennes dans la rétine glaucomateuse : une protéinopathie insolite**

Les données épidémiologiques montrent qu'au-delà de 60 ans, et comparativement à la population générale du même âge, le risque de développer la MA est plus important chez les patients atteints du glaucome (Helmer et al., 2013; Lin et al., 2014). Gupta et al. lors d'analyses post-mortem de la rétine humaine ont observé que par rapport aux contrôles sains du même âge, il y a une accumulation de tau hyperphosphorylée dans les rétines glaucomateuses ayant atteint un stade avancé de la maladie (Gupta et al., 2008). De manière intéressante, cette hausse n'était pas visible dans les phases précoces de la maladie, indiquant ainsi que tout comme dans la MA, l'accumulation de tau dans la rétine est liée à la progression du glaucome. De plus, le dosage de la protéine tau et de l'A $\beta$  dans l'humeur vitrée par ELISA montre que durant la rétinopathie il se produit une nette hausse du niveau de ces deux protéines (Yoneda et al., 2005).

Par ailleurs, des études sur des rats atteints d'HTO font état d'une accumulation d'A $\beta$  dans la CCG, corrélée à une baisse de l'expression d'APP (McKinnon et al., 2002; Guo et al., 2007). Il est également montré chez ce même modèle que l'injection

intraoculaire d'anticorps dirigés contre l'A $\beta$  prévient la mort des CGR par apoptose prouvant ainsi que la formation du peptide est neurotoxique (Guo et al., 2007). Il a été proposé que cet effet neurotoxique d'A $\beta$  provienne de l'activation de la caspase-8 et de la caspase-3. McKinnon et al. démontrent que l'accumulation de l'A $\beta$  dans la rétine des sujets oculohypertensifs est effectivement associée à une activation prononcée des caspases-3 et 8 dans la CCG (McKinnon et al., 2002). Or il a précédemment été prouvé que dans la MA, l'A $\beta$  provoque la mort des neurones en activant justement ces deux caspases (Gschwind and Huber, 1995; Li et al., 1996; Ivins et al., 1999; Stadelmann et al., 1999). Il apparaît donc que la rétine glaucomateuse présente des changements moléculaires usuellement associés à la pathologie alzheimerienne.

### **2.3.2. Manifestations glaucomateuses dans la rétine alzheimerienne : quand l'oubli affecte la vue**

Les données statistiques collectées chez des aînés institutionnalisés montrent qu'à âge équivalent, la fréquence du glaucome est plus importante chez les sujets atteints de la MA comparativement à la population générale (Bayer et al., 2002; Tamura et al., 2006). En d'autres termes, les victimes de la MA sont plus à risque de développer une pathologie glaucomateuse. En outre, les examens ophtalmologiques et neuropsychologiques révèlent que les patients alzheimeriens présentent de nombreux déficits visuels, dont la perte partielle du champ visuel et des anomalies visuospatiales (Lee and Martin, 2004). Par ailleurs l'imagerie du fond de l'œil atteste que la rétine de ces derniers présente une diminution de l'épaisseur de la CFN ainsi qu'une plus forte propension à l'excavation du disque optique ; (Danesh-Meyer et al., 2006) ce qui

témoigne de la présence d'une neuropathie optique. De manière surprenante, une corrélation positive a été décrite entre le degré d'excavation du disque optique et la sévérité de la démence, suggérant ainsi que la neuropathie optique reflète la progression de la pathologie (Tsai et al., 1991). L'analyse histologique de la rétine des victimes de la MA, montre une importante réduction du nombre de somas de CGR dont le cytoplasme prend un aspect vacuolisé. De même, ces rétines présentent une dégénérescence marquée des axones du nerf optique et de la couche de fibres nerveuses (Hinton et al., 1986; Blanks et al., 1989; Sadun and Bassi, 1990). En accord avec les études humaines, les modèles animaux surexprimant l'A $\beta$  ou tau révèlent qu'une accumulation marquée de ces protéines a lieu dans la couche de cellules ganglionnaires (Gasparini et al., 2011; Schön et al., 2012; Gupta et al., 2016), ceci étant associé à des déficits fonctionnels de la rétine (Gupta et al., 2016; Mazzaro et al., 2016). Toutes ces anomalies structurelles et fonctionnelles des CGR observées dans la rétine de sujets souffrant de la MA ne sont pas sans rappeler celles du glaucome.

## **2.4. Problématique, hypothèse et objectifs de la thèse**

### **2.4.1. Problématique de la thèse**

Nous venons de voir que les CGR de sujets glaucomateux manifestent des changements moléculaires spécifiques à la MA. Réciproquement, les CGR des victimes de la MA présentent des anomalies fonctionnelles et structurelles rappelant celles du glaucome. Malgré le fait que le glaucome et la MA ont probablement des étiologies différentes, il semble qu'il existe une cause commune qui sous-tend la perte des CGR à la fois dans le glaucome et la MA. La question qui se pose est donc la suivante : quel est ce mystérieux agent faisant le lien pathologique entre le glaucome et la MA dans la rétine ?

### **2.4.2. Hypothèse de recherche**

Vu le rôle clé que joue la protéine tau dans le maintien de la fonction et de la structure des neurones, et compte tenu de son importance comme médiateur de la toxicité d'A $\beta$ , nous défendons la thèse selon laquelle la dégradation de la protéostase de tau est la cause commune de dégénérescence des CGR dans le glaucome et la MA. Plus spécifiquement notre hypothèse de recherche est la suivante : *l'altération de la protéine tau provoque des déficits fonctionnels qui résultent en la perte des CGR*.

### **2.4.3. Objectifs de la thèse**

Afin de tester notre hypothèse nous avons étudié *in vivo* les dysfonctionnements que tau peut éventuellement subir dans divers contextes pathologiques et nous avons évalué leurs effets sur les CGR. Pour cela deux paradigmes de neurodégénérescence ont été utilisés à

savoir le glaucome et MA. Dans chacune de ces pathologies, nos objectifs spécifiques de recherche étaient les suivants :

- 1) Étudier l'expression protéique et génique de tau dans la rétine.
- 2) Caractériser les modifications post-traductionnelles de tau (phosphorylation, changement de conformation, oligomérisation).
- 3) Établir la distribution cellulaire de tau dans la rétine.
- 4) Déterminer si les altérations de tau affectent le fonctionnement et la survie des neurones rétiniens.

#### **2.4.4. Méthodologie expérimentale**

L'étude du lien entre la pathologie de tau et la survie des CGR que nous avons mené dans cette thèse s'articule autour de deux approches expérimentales différentes, mais complémentaires. La première approche vise à étudier des altérations de tau dans la rétine de sujets glaucomateux ainsi que leurs effets sur la survie des CGR tandis la seconde consiste à identifier les altérations de tau dans la rétine de sujets alzheimeriens ainsi que les conséquences sur le fonctionnement et la survie des CGR.

i) Neurodégénérescence glaucomateuse. Dans la première étude, nous avons utilisé un modèle de rat d'HTO (modèle de Morrison) qui est un modèle préclinique du glaucome très bien caractérisé. Ce modèle offre l'avantage d'offrir une hausse soutenue de la pression intraoculaire résultant en une perte progressive et spécifique du soma et des axones des CGR. Nous avons collecté la rétine et le nerf optique 3 semaines après induction du glaucome afin d'analyser l'expression de la protéine de le ARNm de tau, ses



modifications post-traductionnelles incluant sa phosphorylation et son oligomérisation, et sa distribution cellulaire en utilisant les techniques de western blot, RT-PCR, et immunohistochimie. Afin de déterminer la neurotoxicité de tau, nous avons réduit l'expression de tau dans la rétine glaucomateuse via des ARN d'interférences (short interference RNA, siRNA) et nous avons évalué la survie des CGR par quantification des somas dans la rétine et de leurs axones dans le nerf optique.

ii) Neurodégénérescence alzheimerienne: La seconde étude fait appel au le modèle 3xTg de la MA. Dans ce modèle, le tissu cérébral offre la particularité de présenter à la fois la pathologie amyloïde et la tauopathie lesquelles suivent une évolution spatiotemporelle très bien caractérisée. Utilisant ce modèle nous avons prélevé la rétine et le nerf optique de sujets âgés de 3 et 6 mois ; chez lesquels nous avons étudié l'expression de tau au niveau de la protéine et l'ARNm, ses modifications post-traductionnelles (phosphorylation et changement de conformation) et sa distribution cellulaire par western blot, RT-PCR, et immunohistochimie. Ensuite, nous avons analysé le fonctionnement des CGR par la mesure du transport axonal antérograde et nous avons évalué la survie des CGR par quantification de la densité des somas des CGR dans la rétine entière.

Les résultats de ces deux approches expérimentales constituent l'objet des deux articles ci-dessous lesquels seront présentés respectivement dans les chapitres III et IV.

1) **Tau accumulation, altered phosphorylation, and missorting promote neurodegeneration in glaucoma.** Marius Chiasseu, Jorge Luis Cueva Vargas, Laurie Destroismaisons, Christine Vande Velde, Nicole Leclerc, Adriana Di Polo. Journal of Neuroscience. 2016 May 25 ;36(21) : 5785-98. doi : 10.1523/JNEUROSCI.3986-15.2016

2) **Tau accumulation in the retina of a murine model of Alzheimer's disease precedes brain pathology and promotes retinal ganglion cell dysfunction.** Marius Chiasseu, Luis Alarcon-Martinez, Florence Dotigny, Laurie Destroismaisons, Christine Vande Velde, Adriana Di Polo. Manuscript ready for submission to Molecular Neurodegeneration.

Chapitre III.

Premier article

**Tau accumulation, altered phosphorylation, and missorting promote neurodegeneration in glaucoma**

Abbreviated title: Endogenous tau alterations and retinal neuron death

**Marius Chiasseu<sup>1</sup>, Jorge L. Cueva Vargas<sup>1</sup>, Laurie Destroismaisons<sup>1</sup>, Florence Dotigny<sup>1</sup>, Christine Vande Velde<sup>1</sup>, Nicole Leclerc<sup>1</sup>, Adriana Di Polo<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Department of Neuroscience and Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal, Montreal, QC H2X 0A9, Canada

Corresponding author: Adriana Di Polo, Ph.D.  
Department of Neuroscience  
University of Montreal  
CRCHUM, 900 Rue Saint-Denis  
Tour Viger, Room R09.720  
Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada  
Email : [adriana.di.polo@umontreal.ca](mailto:adriana.di.polo@umontreal.ca)

**KEYWORDS:** Alzheimer's disease; axon degeneration; glaucoma ; neurotoxicity ;  
retinal ganglion cell ; tau

### 3.1. ABSTRACT

Glaucoma, the leading cause of irreversible blindness worldwide, is characterized by the selective death of retinal ganglion cells (RGCs). Ocular hypertension is the most significant known risk factor for developing the disease, but the mechanism by which elevated pressure damages RGCs is currently unknown. The axonal-enriched microtubule-associated protein tau is a key mediator of neurotoxicity in Alzheimer's disease and other tauopathies. Using a well characterized *in vivo* rat glaucoma model, we show an age-related increase in endogenous retinal tau that was markedly exacerbated by ocular hypertension. Early alterations in tau phosphorylation, characterized by epitope-dependent hyper- and hypophosphorylation, correlated with the appearance of tau oligomers in glaucomatous retinas. Our data demonstrate the mislocalization of tau in the somatodendritic compartment of RGCs subjected to high intraocular pressure. In contrast, tau was depleted from RGC axons in the optic nerve of glaucomatous eyes. Importantly, intraocular administration of short interference RNA against tau effectively reduced retinal tau accumulation and promoted robust survival of RGC soma and axons, supporting a critical role for tau alterations in ocular hypertension-induced neuronal damage. Our study reveals that glaucoma displays signature pathological features of tauopathies including tau accumulation, altered phosphorylation and missorting; and identifies tau as a novel target to counter RGC neurodegeneration in glaucoma and prevalent optic neuropathies.

### 3.2. INTRODUCTION

Retinal ganglion cells (RGCs) are prototypical CNS neurons with somatodendritic compartments localized in the innermost part of the retina and axons organized as bundles forming the optic nerve. RGCs are the sole neurons that convey information from the retina to the brain; therefore their structural and functional integrity is critical for vision. RGC death is the cause of visual deficits in prevalent optic neuropathies including glaucoma, the leading cause of irreversible blindness worldwide (Tham et al., 2014). During glaucoma, axons in the optic nerve head are injured leading to progressive RGC neurodegeneration (Calkins, 2012; Nickells et al., 2012). High intraocular pressure is the most significant known risk factor for developing the disease (Sit, 2014; Doucette et al., 2015), but the mechanism by which elevated pressure promotes RGC damage is currently unknown. A better understanding of the neurodegenerative processes triggered by ocular hypertension is, therefore, essential to develop effective therapeutics for glaucoma.

It is increasingly recognized that glaucoma shares a number of pathological features with Alzheimer's disease (AD), the most common cognitive disorder. AD is characterized by two neuropathological lesions: senile plaques composed of amyloid beta (A $\beta$ ) peptides, and neurofibrillary tangles made of insoluble aggregated tau, a microtubule-associated protein enriched in the axon (Binder et al., 1985; Drubin and Kirschner, 1986; Kosik and Finch, 1987). Substantial visual deficits are found in individuals affected by AD including a preferential loss of RGCs, which may account for the impaired contrast sensitivity and motion perception often observed in these patients (Hinton et al., 1986; Blanks et al., 1989; Katz and Rimmer, 1989; Jackson and Owsley, 2003; Lee and Martin, 2004b). Likewise, there is a high occurrence of glaucoma in

subjects with AD, and A $\beta$  and hyperphosphorylated tau have been detected in ocular or cerebrospinal fluid samples from glaucoma patients (Yoneda et al., 2005; Gupta et al., 2008; Nucci et al., 2011)

Recent work supports the idea that neuronal loss in AD and glaucoma is mediated by common neurodegenerative pathways. For example, A $\beta$  accumulation has been observed in experimental glaucoma (McKinnon et al., 2002; Goldblum et al., 2007; Kipfer-Kauer et al., 2010; Ito et al., 2012), and blockade of the A $\beta$  pathway reduced RGC loss (Guo et al., 2007; Salt et al., 2014). It is increasingly recognized that tau is a key mediator of A $\beta$  toxicity (Rapoport et al., 2002; Santacruz et al., 2005; Roberson et al., 2007). Recently, transgenic mice carrying the human P301S tau mutant have been shown to contain tau aggregates in the retina (Schön et al., 2012), notably in RGCs (Gasparini et al., 2011), which was correlated with impaired anterograde and retrograde axonal transport as well as increased susceptibility to excitotoxic damage (Bull et al., 2012). These findings suggest an association between tau aggregation and RGC dysfunction. However, tau mutant models have several limitations including differences in exogenous tau expression compared to endogenous tau in disease (Noble et al., 2010). As such, the role of endogenous tau in RGC damage and whether it contributes to neuronal death in glaucoma is currently unknown.

To address this question, we used a well characterized rat model of ocular hypertension glaucoma that results in selective loss of RGC soma and axons. Our data demonstrate that high intraocular pressure leads to a rapid increase in retinal tau with altered phosphorylation profile and the formation of tau oligomers. Tau accumulation was primarily observed in RGC dendrites, while tau in RGC axons within the optic nerve

markedly decreased. Importantly, tau knockdown using a targeted siRNA led to striking protection of RGC soma and axons from hypertension-induced damage. Our study identifies novel and substantial alterations of endogenous tau protein in experimental glaucoma, which are consistent with cardinal features of a tauopathy including abnormal subcellular distribution, altered phosphorylation profile and neurotoxicity.

### **3.3. MATERIALS AND METHODS**

#### **3.3.1. Experimental animals**

All procedures were performed in male Brown Norway rats aged 2 months (160-200 gr) or 8 months (300-400 gr) (Charles River Laboratories International, Inc., St-Constant, QC) in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care for the Use of Experimental Animals (<http://www.ccac.ca>). Tau knockout mice (strain Mapt<sup>-tm1[EGFP]Klt/J</sup>) were purchased (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and maintained in our animal facility until needed. The number of animals used in each experiment is indicated in the corresponding figure legend and table.

#### **3.3.2. Induction of ocular hypertension**

Unilateral elevation of intraocular pressure was induced by injection of hypertonic saline solution into an episcleral vein as previously described (Morrison et al., 1997; Almasieh et al., 2010). Briefly, a plastic ring was applied to the ocular equator to confine the injection to the limbal plexus and a microneedle was used to inject 50 µl of sterile 1.85 M NaCl through an episcleral vein. Following injection, the plastic ring was removed and the eyes were examined to assess the extent to which the saline solution

traversed the limbal microvasculature. Polysporin ophthalmic ointment (Pfizer Canada Inc., Kirkland, QC) was applied to the operated eye and the animal was allowed to recover. Eye pressure measurements were taken from awake animals after corneal application of one drop of proparacaine hydrochloride (0.5%, Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) using a calibrated tonometer (TonoPen XL; Medtronic Solan, Jacksonville, FL). The tonometer was held perpendicular to the corneal surface and ten consecutive readings per eye were taken and averaged. Intraocular pressure was measured every other day, at the same time, for the entire duration of the experiment. The mean and peak (maximum) intraocular pressure values for each eye were calculated and used to estimate the mean and peak pressure for experimental and control groups.

### **3.3.3. Western blot analyses**

Whole retinas were isolated and homogenized in ice-cold lysis buffer: 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM Na fluoride, 0.25% Na deoxycholate and 2 mM NaVO<sub>3</sub> supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein homogenates were centrifuged at 18,000 g for 5 min, and the supernatants were removed and resedimented to yield soluble extracts. Samples in Laemmli buffer were boiled for 5 min (except for visualization of tau oligomers), resolved in 7.5% SDS polyacrylamide gels, and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON). Blots were incubated in SuperBlock T20 blocking solution (ThermoScientific, Ottawa, ON) for 1 hr at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with each of the following primary antibodies: total tau (K9JA, 1 µg/ml, Dako North America, Carpinteria, CA), phospho-tau S396-S404 (PHF1, 1:100,



gift of P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY), phospho-tau S199 (PS199, 1 µg/ml, Invitrogen, Burlington, ON), phospho-tau S202-T205 (AT8, 0.8 µg/ml, ThermoScientific), oligomeric tau (T22, 1:200, gift of R. Kayed, University of Texas, TX), or β-actin (0.5 µg/ml, Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Membranes were washed and incubated in peroxidase-linked anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies (0.5 µg/ml, GE Healthcare, Mississauga, ON). Blots were developed with a chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Biosciences) and exposed to X-OMAT imaging film (Eastman Kodak, Rochester, NY). Densitometry was performed using ImageJ software on scanned autoradiographic films obtained from at least three independent western blots each carried out using retinal samples from different groups.

#### **3.3.4. Retina and optic nerve immunohistochemistry**

Animals were perfused with 4% paraformaldehyde and the eyes and optic nerves were rapidly dissected. Tissue was embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN), and retinal (16 µm) or optic nerve (12 µm) cryosections were collected onto gelatin-coated slides as described (Pernet and Di Polo, 2006; Wilson et al., 2013). Some eyes were embedded in paraffin for generation of thin retinal cross sections (4 µm) using a microtome (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). The following primary antibodies were added to retinal or optic nerve sections in blocking solution and incubated overnight at 4°C as described (Planel et al., 2004; Wilson et al., 2014): total tau (K9JA, 2-10 µg/ml, Dako), total tau (Tau 46, 1:1000, New England Biolabs, Whitby, ON), choline acetyltransferase (ChAT, 1 µg/ml, Millipore, Billerica, MA), calbindin (1:1000, Swant, Marly, Switzerland), protein kinase C alpha

(PKC $\alpha$ , 3  $\mu$ g/ml, Enzo Life Science, Farmingdale, NY), neurofilament H (NF-H, 10  $\mu$ g/ml, Sternberger Monoclonals, MD, USA), and/or tubulin isoform  $\beta$ III (TUJ1, 2.5  $\mu$ g/ml, Sigma-Aldrich). Sections were washed and incubated with secondary antibodies: donkey anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 594 and 488 (2  $\mu$ g/ml, Life Technologies, Eugene, OR). Fluorescent labeling was observed using a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss, Canada) or a confocal microscope (Leica Microsystems Inc., Concord, ON).

### **3.3.5. Reverse transcription and quantitative real time PCR (qPCR)**

Total RNA was isolated from individual retinas using the RNEasy Mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). cDNAs were generated from 1  $\mu$ g of total RNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed using TaqMan probes and primers against rat pan-tau (Cat# Rn01495715), rat big tau (Cat# Rn01495711), and 18S ribosomal RNA as control (Cat# 4308329) (Applied Biosystems, Waltham, MA). Amplification was performed using the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with the following cycle conditions: 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min. Reactions were run in triplicates for each sample and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formula was used for the calculation of differential gene expression.

### **3.3.6. Short interfering RNA (siRNA)**

siRNA sequences against tau (siTau) were purchased from Dharmacon (ON-TARGET plus Smartpool, Thermo Scientific, Lafayette, CO) (sense strands): i) 5'-GCAUGUGACUCAAGCUCGA-3', ii) 5'-AGUUAGGGACGAUGCCGGUA-3', iii) 5'-

GAUAG AGUCCAGUCGAAGA-3', and iv) 5'-GGACAGGAAAUGACGAGAA-3'. An siRNA against green fluorescent protein (siGFP) was used as control. Each siRNA (2 µg/µl, total volume: 5 µl) was injected into the vitreous chamber using a Hamilton syringe fitted with a 32-gauge glass microneedle. The sclera was exposed and the tip of the needle inserted into the superior ocular hemisphere at a 45° angle through the sclera and retina into the vitreous space using a posterior approach. This route of administration avoids injury to the iris or lens, which can promote RGC survival (Mansour-Robaey et al., 1994; Leon et al., 2000). After the injection, the needle was left in the eye for 1 min to allow the solution to diffuse into the vitreous chamber and to prevent backflow. Surgical glue (Indermill, Tyco Health Care, Mansfield, MA, USA) was immediately applied to seal the injection site.

### **3.3.7. Quantification of RGC soma and axons**

Quantification of RGC soma and axons was performed in duplicate by an observer masked to the experimental conditions. Rats were euthanized by transcardial perfusion with 4% PFA and retinas were dissected out and fixed for an additional 15 min. Brn3a immunodetection on whole-mounted retinas was performed as described (Nadal-Nicolas et al., 2009). Briefly, whole retinas were permeabilized in PBS containing 0.5% Triton X-100 (Fisher, Waltham, MA) by freezing them at -80°C for 15 min, rinsed and incubated overnight at 4°C with goat-anti-Brn3a (C-20, 0.27 µg/ml, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) in blocking buffer (PBS, 2% normal donkey serum, 2% Triton X-100). Retinas were washed and incubated for 2 hrs at room temperature with Alexa Fluor donkey anti-goat IgG (1 µg/ml, Jackson ImmunoResearch Laboratories

Inc.). Retinas were then rinsed, mounted vitreal side up, and covered with anti-fade solution (SlowFade, Molecular Probes, Eugene, OR). Brn3a-labeled neurons were counted within three square areas at distances of 1, 2 and 3 mm from the rat optic disc in each of the four retinal quadrants for a total of twelve retinal areas. Fluorescent staining was examined with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss Canada). Images were captured with a CCD video camera (Retiga, Qimaging, Burnaby, BC) and analyzed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON).

For axon counts, animals received a transcardial injection of heparin (1000 u/kg) and sodium nitroprusside (10 mg/kg) followed by perfusion with 2% PFA and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS. Optic nerves were dissected, fixed in 2% osmium tetroxide, and embedded in epon resin. Semi-thin sections (0.7  $\mu\text{m}$ ) were cut on a microtome (Reichert, Vienna, Austria) and stained with 1% toluidine blue. Images were acquired using an oil-immersion 63X objective (numerical aperture: 1.4). RGC axons were counted at 1 mm from the optic nerve head in five non-overlapping areas of each optic nerve section, encompassing a total area of 5,500  $\mu\text{m}^2$  per nerve. The five optic nerve areas analyzed included: one in the center of the nerve, two peripheral dorsal and two peripheral ventral regions. The total area per optic nerve cross-section was measured using Northern Eclipse image analysis software (Empix Imaging, Toronto, ON), and this value was used to estimate the total number of axons per optic nerve.

### **3.3.8. Statistical analyses**

Data analysis and statistics were performed using GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) by a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Bonferroni *post hoc* test, or by a Student's *t* test as indicated in the legends.

### **3.4. RESULTS**

#### **3.4.1. Age modulates the expression and phosphorylation profile of retinal tau**

Glaucoma, like AD, is an age-related neurodegenerative disorder (Leske et al., 2003). Tau is a highly soluble, natively unfolded protein with an expression profile that varies with age (Maeda et al., 2006; Morawe et al., 2012). Therefore, we first asked whether age influences the levels of endogenous retinal tau. For this purpose, retinal protein samples from 2-month-old and 8-month-old rats without any ocular injury (intact) were compared. Eight-month-old animals were selected because this is the typical age of retired breeder Brown Norway rats used to develop the ocular hypertension model employed in this study (Morrison et al., 1997; Almasieh et al., 2010). Western blot analysis of soluble retinal extracts using an antibody against total tau (K9JA), which recognizes the C-terminus microtubule binding region irrespective of its phosphorylation state (Biernat et al., 2002; Plouffe et al., 2012), demonstrated the presence of three predominant tau isoforms of 50-kDa, 55-kDa and 100-kDa (Fig. 1A). Densitometric analysis showed a 1.7-fold and 2.8-fold increase in the 50-kDa and 100-kDa tau variants, respectively, in samples from 8-month-old compared to younger animals, while no significant change was detected for the 55-kDa form (Fig. 1B). To validate the specificity of the total tau antibody K9JA, retinas from wild-type (Tau<sup>+/+</sup>) and tau deficient (Tau<sup>-/-</sup>)

mice were analyzed. All tau isoforms were observed in Tau<sup>+/+</sup> mouse retinas, whereas no signal was detected in Tau<sup>-/-</sup> murine retinal samples confirming that K9JA selectively recognizes tau (Fig. 1C, D).

Next, we examined whether aging affected tau phosphorylation using antibodies that selectively recognize the phospho-tau epitopes PHF1 (Ser396, Ser404), PS199 (Ser199), and AT8 (Ser202, Thr205) (Otvos et al., 1994; Petry et al., 2014). These epitopes were selected because they are located in distinct domains of the tau protein and are readily recognized by highly specific antibodies (Petry et al., 2014). Visualization of blots probed with PHF1 and PS199 revealed an age-dependent increase in phosphorylation at these sites (Fig. 1E, F). However, densitometric analysis of phospho-tau signals with respect to total tau, which increased with age, revealed a relative decrease in tau phosphorylation at epitopes recognized by PHF1 (50-kDa, 100-kDa) and PS199 (50-kDa) in 8-month-old retinal samples (Fig. 1H, I). No significant changes were detected with AT8 (Fig. 1G, J). Collectively, these data indicate that the level of retinal tau protein increases with age and undergoes alterations in its phosphorylation profile. To exclude any confounding effect of age, all subsequent experiments were performed using age-matched controls.

### **3.4.2. Ocular hypertension promotes retinal tau upregulation and epitope-dependent changes in phosphorylation**

Unilateral ocular hypertension was induced in 8-month-old Brown Norway rats by a single injection of hypertonic saline into an episcleral vein as described (Morrison et al., 1997; Almasieh et al., 2010; Cueva Vargas et al., 2015). This procedure leads to

blockade of aqueous humor outflow, gradual increase of eye pressure and selective loss of RGC soma and axons. Using this model system, we first asked whether there are variations in endogenous tau levels following glaucoma induction. Our analysis focused on events at 3 weeks after saline injection because increased intraocular pressure is stable at this time point, and neuronal degeneration has started but it is not yet overt as in later stages of the disease (Cueva Vargas et al., 2015). Figure 2A shows the intraocular pressure for individual animals over the 3-week period. A mean increase of 38 mm Hg in glaucomatous eyes was observed compared to 22 mm Hg in non-injured intact eyes, well within the range of pressure increase reported in this model (Almasieh et al., 2013; Cueva Vargas et al., 2015; Morrison et al., 2015).

Western blot analysis showed a substantial increase of tau in retinas with high intraocular pressure compared to intact controls (Fig. 2B). Densitometry demonstrated a 3.2-fold, 3.4-fold and 4.9-fold increase in the 50-kDa, 55-kDa and 100-kDa bands, respectively (Fig. 2C). Real-time qPCR analysis was performed using primers that recognize all tau forms (pan-tau) and big tau, a high molecular weight isoform (110 kDa) that has been detected in the peripheral nervous system, spinal cord and retina (Oblinger et al., 1991; Goedert et al., 1992; Boyne et al., 1995). No changes in tau mRNA levels were detected in glaucomatous retinas compared to controls (Fig. 2D), suggesting that tau protein upregulation is not the result of increased gene expression.

Marked changes in retinal tau phosphorylation on epitopes PHF1 and PS199 were observed in ocular hypertensive eyes (Fig. 2E, F). Densitometric analysis of phospho-tau signals relative to total tau showed that all forms of tau underwent increased phosphorylation on S396 and S404 residues recognized by PHF1 in glaucomatous retinas

compared to intact controls (Fig. 2H). In contrast, reduced phosphorylation of S199 was detected relative to total tau (Fig. 2I). Changes in S202 and Thr205 phosphorylation using AT8 were not statistically significant (Fig. 2G, J). These results demonstrate that ocular hypertension increases the levels of retinal tau protein and, intriguingly, alters its phosphorylation profile towards epitope-dependent hyperphosphorylation or hypophosphorylation.

### **3.4.3. Altered phosphorylation drives tau accumulation and oligomerization in glaucomatous retinas**

Accumulating evidence indicates that tau oligomers, an intermediate species between native tau monomers and aggregated tau found in neurofibrillary tangles, are highly toxic and promote neuronal deficits and death (Gerson and Kaye, 2013). Thus, we asked whether the increase in the 100-kDa tau form observed in glaucomatous retinas was the result of dimerization of 50/55-kDa tau monomers. Analysis of 100-kDa/total tau versus total tau demonstrated a positive correlation between the levels of the 50-kDa species and accumulation of the 100-kDa form (Fig. 3A). In contrast, no significant correlation was observed between the levels of the 55 kDa and 100 kDa tau species (Fig. 3B), suggesting that the 55-kDa form does not contribute to tau dimerization. Abnormal phosphorylation of tau monomers has been shown to promote accumulation and, ultimately, oligomerization (Sahara et al., 2007; Tepper et al., 2014). Therefore, we also analyzed the correlation between phosphorylated tau/total tau versus total tau in glaucomatous retinas (Fig. 3C-F). Phosphorylation on the PHF1 epitope (S396, S404) correlated positively with 50-kDa tau accumulation (Fig. 3C), while no significant



correlation was found for 55-kDa tau (Fig. 3D). A negative correlation was found between S199 phosphorylation on 50-kDa and 55-kDa tau and total protein level (Fig. 3E, F), suggesting that loss of phosphorylation at this residue favors accumulation and subsequent oligomerization.

To further investigate whether ocular hypertension leads to retinal tau oligomerization, we performed western blot analysis of retinal samples under non-denaturing conditions using T22, an antibody that selectively recognizes tau oligomers at the exclusion of monomers (Lasagna-Reeves et al., 2010; Lasagna-Reeves et al., 2012). Our data show a marked increase in T22-positive 100-kDa tau (Fig. 3G, H) supporting the possibility that this tau form results from oligomerization of monomeric 50/55-kDa tau. In addition, a new 250-kDa tau species was detected with T22 in hypertensive retinas (Fig. 3G, H), suggesting that tau monomers can aggregate to form larger multimeric complexes. Together, these data suggest that altered phosphorylation and accumulation of monomers promote tau oligomerization in glaucoma.

#### **3.4.4. Tau accumulates in the RGC somatodendritic compartment in glaucoma**

To establish the cellular localization of tau, we first performed immunohistochemical analysis using antibodies against total tau. Low levels of endogenous tau, primarily in the synaptic outer and inner plexiform layers (IPL, OPL), were detected in control non-injured retinas (Fig. 4A). In glaucomatous retinas, tau protein levels increased substantially (Fig. 4B), confirming our biochemical findings. Marked tau increase was observed in the IPL, where RGC dendrites are located, with

modest increase in the ganglion cell layer (GCL), the location of RGC soma (Fig. 4B). In addition to RGCs, displaced amacrine cells and astrocytes populate the GCL (Perry, 1981), hence we performed experiments using an antibody against tubulin isoform  $\beta$ III (TUJ1), which selectively labels RGC soma and dendrites in the retina (Cui et al., 2003; Yin et al., 2003). Co-labeling of glaucomatous retinas with K9JA and TUJ1 demonstrated tau increase in RGC soma and dendrites (Fig 4C-E). Confocal microscopy analysis validated tau protein expression in TUJ1-positive RGCs, both in the cytoplasm and in dendritic branches (Fig. 4F-H). Some tau-positive cells were also detected in the inner nuclear layer (INL) and were identified as horizontal cells, as previously described in human glaucomatous retinas (Gupta et al., 2008), ChAT-positive amacrine cells (Fig. 4L-N), and PKC $\alpha$ -positive bipolar cells (Fig. 4O-Q). We conclude that tau protein accumulates in glaucomatous retinas, most notably in the somatodendritic compartment of RGCs.

#### **3.4.5. Tau is markedly downregulated in optic nerve RGC axons in glaucoma**

In physiological conditions, tau protein is predominantly localized to axons with only low levels found in the cytoplasm and dendrites (Migheli et al., 1988). In AD, tau detaches from axonal microtubules and accumulates in the somatodendritic compartment of affected neurons . RGC axons have been identified as a major site of injury in glaucoma; therefore, we examined tau expression in the optic nerve at 3 weeks after induction of ocular hypertension. In control normotensive eyes, tau was enriched in RGC axons visualized with the axonal marker neurofilament-H (NF-H) (Fig. 5A-F). In

contrast, optic nerves from glaucomatous eyes displayed a striking reduction in tau protein (Fig. 5G). Although many RGC axons are lost at 3 weeks of ocular hypertension, low tau levels could not be solely attributed to axonal death because co-labeling with NF-H established that RGC axons were still abundant at this time point (Fig. 5H, I). Indeed, confocal microscopy analysis of fascicular axon bundles confirmed intense NF-H labeling in axons that lacked or had very low levels of tau (Fig. 5J-L), indicating a striking loss of tau in surviving axons. Consistent with this, western blot analysis of optic nerve homogenates showed a substantial decrease in total tau; most notably the 50-kDa and 55-kDa forms, in nerves from glaucomatous eyes compared to intact controls (Fig. 5M, N). To investigate the presence of tau in intraretinal, non-myelinated RGC axons, immunolabeling of whole-mounted retinas with tau and NF-H antibodies was performed. Our results show low levels of tau in RGC intraretinal axons of naïve retinas which increased visibly with ocular hypertension (Fig. 5O-T). Collectively, these results indicate that tau is markedly reduced in RGC axons within the optic nerve, while it accumulates in the RGC somatodendritic compartment and in intraretinal axons, suggesting abnormalities in tau transport and/or localization in glaucoma.

#### **3.4.6. Selective tau knockdown promotes survival of RGC soma and axons**

To establish whether alterations in tau mediate loss of RGCs in glaucoma, we sought to reduce tau expression by using short interfering RNA (siRNA) followed by analysis of RGC survival. First, we assessed the ability of a targeted siRNA against tau (siTau) to reduce retinal tau protein levels. We previously demonstrated that siRNA delivered by intravitreal injection is rapidly taken up by RGCs (Wilson et al., 2013;

Wilson et al., 2014; Morquette et al., 2015). Western blot analysis of retinal homogenates from eyes that received siTau one week after induction of ocular hypertension showed a significant reduction in Tau protein, most notably the 50-kDa and 100-kDa forms, while a control siRNA against green fluorescent protein (siGFP) had no effect (Fig. 6A, B). Immunohistochemistry of glaucomatous retinas confirmed that tau downregulation occurred primarily in the IPL and GCL following siTau administration, while no change was observed with control siGFP (Fig. 6C, D). Next, we investigated whether siRNA-mediated tau knockdown resulted in RGC rescue. For this purpose, siTau was injected intraocularly at 1 and 2 weeks after induction of ocular hypertension, and RGC survival was evaluated a week later (3 weeks after injury onset). Cell soma and axon quantification was performed blinded to treatment. Flat-mounted retinas from eyes treated with siTau showed higher densities of cells labeled with Brn3a, a RGC-specific marker (Nadal-Nicolás et al., 2009), compared to retinas treated with control siGFP (Fig. 7A-C). Quantitative analysis demonstrated that siTau promoted significant RGC survival (92%:  $1966 \pm 39$  RGCs/mm<sup>2</sup>, mean  $\pm$  S.E.M., N=10) with respect to eyes that received siGFP (75% :  $1599 \pm 40$  RGCs/mm<sup>2</sup>, N=9) (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Fig. 7G, Table 1).

A hallmark of glaucoma is the degeneration of RGC axons in the optic nerve posterior to the lamina cribrosa; therefore, we also investigated the capacity of siTau to protect axons. Analysis of optic nerve cross-sections showed a substantially larger number of RGC axon fibers with normal morphology in siTau-treated eyes compared to siGFP-treated controls (Fig. 7D-F). The latter displayed extensive axon degeneration including disarray of fascicular organization and degradation of myelin sheaths. Quantitative analysis confirmed that siTau promoted marked protection of RGC axons

(78%:  $79701 \pm 4606$  axons/nerve, mean  $\pm$  S.E.M., N=6) compared to control siRNA treatment (57% :  $58083 \pm 6246$  axons/nerve, N=6) (ANOVA,  $p < 0.05$ ) (Fig. 7H, Table 1). Intraocular injection of siTau in naïve eyes following the same regimen used for glaucomatous eyes did not alter the density of RGC soma or axons (Fig. 7G, H) suggesting that tau downregulation does not affect RGC survival in physiological conditions over the 3-week period studied. The mean pressure elevation among siTau-treated and siGFP-treated groups was similar (siTau :  $34.7 \pm 3.1$  mm Hg ; siGFP :  $34.6 \pm 1.7$  mm Hg), thus ruling out pressure reduction by siTau as the cause of neuroprotection. In summary, our results demonstrate that attenuation of retinal tau levels protects both RGC soma and axons from ocular hypertension-induced damage, suggesting a prominent pathological role of tau in glaucomatous RGC death.

### **3.5. DISCUSSION**

Data presented here using a well characterized rat glaucoma model reveal that dysregulation of endogenous tau plays a significant role in RGC neurodegeneration. First, we demonstrate that tau accumulates with age and ocular hypertension, and undergoes epitope-dependent changes in phosphorylation. Second, we show that tau accumulation drives the formation of oligomers in the glaucomatous retina. Third, our data indicate that tau build up in RGCs occurs primarily in dendrites, whereas it is nearly depleted from RGC axons. Lastly, our results demonstrate that tau knockdown promotes robust RGC survival supporting a critical role for tau alterations in ocular hypertension-induced neuronal damage. Collectively, this study reveals that ocular hypertension glaucoma

displays signature pathological features of tauopathies including tau accumulation, altered phosphorylation and missorting leading to neurodegeneration.

Tau protein binds to and stabilizes microtubules; therefore it plays a crucial role in the maintenance and function of axons. The expression of the tau gene (*MAPT*) is intricately regulated by alternative splicing to generate multiple isoforms, six of which have been identified in the adult human brain (Andreadis, 2005; Caillet-Boudin et al., 2015). Tau splicing depends on developmental stage, tissue type, and species. In the adult rat retina, we detected three predominant tau forms weighing 50 kDa, 55 kDa and 100 kDa. Our data show that retinal tau levels increase with age, which is consistent with tau accumulation in the retinas of elderly individuals (Leger et al., 2011). Age is a major risk factor for developing AD and glaucoma, and age-dependent progression of tau pathology, including behavioral phenotypes and memory deficits, are found in most tauopathies (Ghoshal et al., 2002; Ashe and Zahs, 2010). Therefore, the accumulation of retinal tau with age may enhance neuronal susceptibility to stress-related damage in glaucoma.

Our data show a marked increase in all retinal tau species accompanied by changes in phosphorylation in glaucomatous eyes compared to age-matched controls. Intriguingly, we found that while tau residues S396 and S404 were hyperphosphorylated, there was a net decrease in phospho-S199 relative to total tau levels. Phosphorylation is a critical post-translational modification of tau during development and in pathological conditions (Hanger et al., 2009). Inclusions of highly phosphorylated tau are found in most tauopathies including AD and correlate with severity of disease (Augustinack et al., 2002a; Sergeant et al., 2008). Specifically, phosphorylation on residues S396 and S404 has been described in the brains of tauopathy patients and are known to impair

microtubule binding and facilitate tau aggregation (Fontaine et al., 2015). Although S199 phosphorylation is also found in tauopathies and promotes tau accumulation (Hanger et al., 2009), we report relative loss of S199 phosphorylation in experimental glaucoma. Accumulating evidence indicate that some stress signals, including oxidative stress, excitotoxicity and starvation, do not induce hyperphosphorylation but rather hypophosphorylation of tau (Davis et al., 1997; Kuszczyk et al., 2009; Mohamed et al., 2014). Furthermore, tau dephosphorylation has been reported following ischemia, hypoxia and glucose deprivation in *in vivo* models and in human brain tissue (Shackelford and Nelson, 1996; Burkhart et al., 1998; Shackelford and Yeh, 1998; Mailliot et al., 2000). Our findings indicate that ocular hypertension-induced changes in tau phosphorylation are complex and epitope-specific, and suggest that both tau hyper- and hypo-phosphorylation might regulate neurodegenerative changes.

Tau neurofibrillary tangles have been historically considered a hallmark of tauopathies, however, accumulating evidence indicates that they are not the most toxic tau species. For example, neuronal loss occurs prior to neurofibrillary tangle formation in AD (Gómez-Isla et al., 1997; Vogt et al., 1998; Terry, 2000; van de Nes et al., 2008), and synaptic dysfunction, cell death and behavioral deficits in tauopathy models occur in the absence of tangles (Wittmann et al., 2001; Santacruz et al., 2005; Spires et al., 2006; Yoshiyama et al., 2007). Tau oligomers, an intermediate species between tau monomers and neurofibrillary tangles, are highly toxic and have emerged as crucial agents in the onset and propagation of disease (Maeda et al., 2006; Patterson et al., 2011c; Lasagna-Reeves et al., 2012; Gerson et al., 2014). Our data demonstrate a correlation between tau monomer increase and accumulation of 100-kDa tau. This could not be attributed to

transcriptional upregulation of big tau, a 110-kDa isoform found in retinal and peripheral neurons (Boyne et al., 1995), because there was no change in mRNA levels in glaucomatous versus control eyes. Furthermore, higher molecular weight tau multimeric complexes (250-kDa) were only detected in ocular hypertensive retinas. These findings suggest that endogenous retinal tau monomers are converted to oligomers in glaucoma, which can be potentially toxic to susceptible RGCs.

In AD and other tauopathies, abnormal tau localization to compartments other than the axon, including soma, dendrites and spines, strongly correlates with neuronal loss and cognitive decline (Zempel and Mandelkow, 2014). We demonstrate robust tau accumulation in RGC dendrites and intraretinal axons in experimental glaucoma. Gene expression in the GCL is rapidly altered following intraocular pressure elevation in rats (Guo et al., 2011), hence a simple explanation would be that ocular hypertension upregulates retinal tau gene transcription. However, lack of changes in tau mRNA levels rules out transcriptional regulation as a mechanism for tau accumulation in glaucomatous retinas. Impaired axonal transport along RGCs, with early anterograde transport deficits, has been well documented in animal models and in human glaucoma (Crish et al., 2010; Fahy et al., 2015). Since tau protein is sorted from RGC soma to axons (Scholz and Mandelkow., 2014), anterograde transport impairment can potentially result in tau accumulation in RGC dendrites. Missorted tau in dendrites has been shown to target the postsynaptic protein Fyn and consequently increase A $\beta$ -mediated excitotoxicity in mice (Ittner et al., 2010; Roberson et al., 2011). Microtubule breakdown accompanied by spine and mitochondrial loss occurs in dendrites invaded by missorted tau, a process mediated by the microtubule-severing enzyme spastin (Lacroix et al., 2010; Zempel et al., 2013).



Of interest, emerging data indicate that ocular hypertension or acute optic nerve damage triggers rapid dendritic pathology in RGCs, which can lead to synaptic rearrangements, functional deficits and death (Agostinone and Di Polo, 2015). Future work is needed to establish whether tau accumulation in RGC dendrites is linked to dendritic pathology and neuronal death in glaucoma.

The increase of tau in other retinal layers together with our finding that there is no change in retinal tau mRNA allow us to put forward the mechanistic hypothesis that tau accumulates in non-RGC cells by trans-synaptic spreading. Indeed, tau protein can spread along anatomically connected neurons, from one cell to another, presumably through synaptic release and uptake at neighboring synapses (Liu et al., 2012; Pooler et al., 2013). In Alzheimer's disease, tau propagates in a stereotypical manner from the entorhinal cortex to the hippocampus and neocortex by neuron-to-neuron spreading of tau aggregates (Clavaguera et al., 2015). Accumulating evidence supports the notion that other retinal neurons are affected in glaucoma and undergo some form of dysfunction. High intraocular pressure alters retinal function before irreversible structural damage in the optic nerve occurs, suggesting early synaptic defects in inner retinal neurons (Frankfort et al., 2013; Pang et al., 2015). Other studies have demonstrated alterations in outer retinal neurons in experimental glaucoma (Fernández-Sánchez et al., 2014; Ortín-Martínez et al., 2015; Vidal-Sanz et al., 2015). It will be of interest to experimentally test the mechanism of tau accumulation in other retinal neurons and, more importantly, to ascertain whether this affects retinal function and RGC susceptibility in glaucoma.

We also report marked depletion of tau from RGC axons in glaucoma. Loss of axonal tau could not be solely ascribed to axon death because a significant number of

axons in the optic nerve were devoid of tau despite their well-preserved structure. As tau protein moves along RGC axons in physiological conditions (Scholz and Mandelkow, 2014), impaired anterograde transport may account for some loss of axonal tau. Alternatively, changes in tau phosphorylation might reduce its affinity for axonal microtubules and increase it for dendritic microtubules, as shown in cultured spinal cord neurons (Kanai and Hirokawa, 1995). Our observation that tau accumulates in the retina at the expense of tau in axons without gene expression changes suggests that increased retinal tau protein might be axonally-derived. Loss of tau leads to destabilization and breakdown of the axonal microtubule network, disruption of axonal transport, and potentially neuronal death (Feinstein and Wilson, 2005; Levy et al., 2005). Thus, it is possible that the loss of tau in RGC axons reported here compromises axonal stability and function thus contributing to neurodegeneration.

To test whether tau accumulation in the retina is toxic for RGCs, we used siRNA administered intraocularly to reduce tau levels in glaucomatous eyes. This siRNA-based strategy was chosen based on the capacity to selectively attenuate tau, without completely inhibiting it, and our observation that siRNAs are readily taken up by RGCs when injected into the vitreous space (Ahmed et al., 2011; Wilson and Di Polo, 2012; Morquette et al., 2015). The reason for the apparent preference of intravitreally delivered siRNA for RGCs is unclear, but it may result from the strategic position of these neurons, directly exposed to the vitreous humor, thus allowing rapid siRNA uptake. The onset of siRNA treatment at one week after induction of ocular hypertension was selected to more closely model a common clinical situation in which people with glaucoma do not experience noticeable symptoms and do not seek medical help until vision loss has

begun, a time when there is already tangible RGC death (Quigley, 2011). Our data show that administration of siTau successfully reduced retinal tau levels and promoted robust RGC soma and axon survival in glaucomatous eyes. The observation that siTau effectively rescued RGCs, without altering intraocular pressure, provides strong proof-of-principle for a detrimental gain-of-function role of tau in glaucoma. The altered pattern of tau phosphorylation we report here suggests a potential contribution in the formation of tau oligomers and RGC death. Therefore, by reducing the total amount of retinal tau protein available for phosphorylation siTau is likely to attenuate tau aggregation and neuronal death. Of interest, although this siRNA approach only decreased tau levels in the retina, we observed substantial survival of both RGC soma and axons. The decrease of tau burden in the retina appears to have a widespread beneficial effect on the overall health of RGCs leading to improvements in axonal transport and functionality. Previous studies have demonstrated the benefits of modulating tau levels and activity by kinase inhibitors and phosphatase activators, immunotherapies, inhibitors of protein aggregation and microtubule-stabilizing agents (Himmelstein et al., 2012). The use of siRNA is now added to the arsenal of strategies to limit the toxic effects of tau while re-establishing cellular homeostasis.

In summary, our data demonstrate a number of important alterations in endogenous tau induced by ocular hypertension including phosphorylation, oligomerization and accumulation in RGC dendrites. These pathological changes contribute to neurodegeneration because reducing tau burden promoted substantial protection of RGC soma and axons from glaucomatous damage. These results reveal that glaucoma shares key common features with tauopathies, and identify tau as a novel

therapeutic target to potentially counter RGC neurodegeneration in glaucoma and other optic neuropathies

### **3.6. REFERENCES**

- Agostinone J, Di Polo A (2015) Retinal ganglion cell dendrite pathology and synapse loss: implications for glaucoma. *Prog Brain Res* 220:199-216.
- Ahmed Z, Kalinski H, Berry M, Almasieh M, Ashush H, Slager N, Brafman A, Spivak I, Neeha Prasad<sup>1</sup> N, Mett I, Shalom E, Alpert E, Di Polo A, Feinstein E, Logan A (2011) Ocular neuroprotection by siRNA targeting caspase-2. *Cell Death Dis* 2:e173.
- Almasieh M, Zhou Y, Kelly MEM, Casanova C, Di Polo A (2010) Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Death Dis* 1:e7.
- Almasieh M, MacIntyre JN, Pouliot M, Casanova C, Vaucher E, Kelly MEM, Di Polo A (2013) Acetylcholinesterase inhibition promotes retinal vasoprotection and increases ocular blood flow in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:3171-3183.
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739:91-103.
- Ashe KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66:631-645.

- Augustinack J, Schneider A, Mandelkow E, Hyman B (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:26-35.
- Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:663-672.
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13:4013-4028.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Blanks JC, Hinton DR, Sadun AA, Miller CA (1989) Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res* 501:364-372.
- Boyne L, Tessler A, Murray M, Fischer I (1995) Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J Comp Neurol* 358:279-293.
- Bull ND, Guidi A, Goedert M, Martin KR, Spillantini MG (2012) Reduced axonal transport and increased excitotoxic retinal ganglion cell degeneration in mice transgenic for human mutant P301S tau. *PLoS ONE* 7:e34724.
- Burkhardt KK, Beard DC, Lehman RAW, Billingsley ML (1998) Alterations in tau phosphorylation in rat and human neocortical brain slices following hypoxia and glucose deprivation. *Exp Neurol* 154:464-472.
- Caillet-Boudin M-L, Buee L, Sergeant N, Lefebvre B (2015) Regulation of human MAPT gene expression. *Mol Neurodegener* 10:28.

- Calkins DJ (2012) Critical pathogenic events underlying progression of neurodegeneration in glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 31:702-719.
- Clavaguera F, Hench J, Goedert M, Tolnay M (2015) Prion-like transmission and spreading of tau pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41:47-58.
- Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ (2010) Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proc Nat Acad Sci USA* 107:5196-5201.
- Cueva Vargas JL, Osswald IK, Unsain N, Aourousseau MR, Barker PA, Bowie D, Di Polo A (2015) Soluble tumor necrosis factor alpha promotes retinal ganglion cell death in glaucoma via calcium-permeable AMPA receptor activation. *J Neurosci* 35:12088-12102.
- Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR (2003) Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 22:49-61.
- Davis DR, Anderton BH, Brion J-P, Reynolds CH, Hanger DP (1997) Oxidative stress induces dephosphorylation of  $\tau$  in rat brain primary neuronal cultures. *J Neurochem* 68:1590-1597.
- Doucette LP, Rasnitsyn A, Seifi M, Walter MA (2015) The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis. *Surv Ophthalmol* 60:310-326.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739-2746.
- Fahy ET, Chrysostomou V, Crowston JG (2015) Impaired axonal transport and glaucoma. *Curr Eye Res* 19:1-11.

- Feinstein SC, Wilson L (2005) Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta* 1739:268-279.
- Fernández-Sánchez L, de Sevilla Müller LP, Brecha NC, Cuenca N (2014) Loss of outer retinal neurons and circuitry alterations in the DBA/2J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:6059-6072.
- Fontaine S, Sabbagh J, Baker J, Martinez-Licha C, Darling A, Dickey C (2015) Cellular factors modulating the mechanism of tau protein aggregation. *Cell Mol Life Sci* 72:1863-1879.
- Frankfort BJ, Khan AK, Tse DY, Chung I, Pang J-J, Yang Z, Gross RL, Wu SM (2013) Elevated intraocular pressure causes inner retinal dysfunction before cell loss in a mouse model of experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol & Vis Sci* 54:762-770.
- Gasparini L, Anthony Crowther R, Martin KR, Berg N, Coleman M, Goedert M, Spillantini MG (2011) Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: effects on axonal viability. *Neurobiol Aging* 32:419-433.
- Gerson J, Sengupta U, Lasagna-Reeves C, Guerrero-Munoz M, Troncoso J, Kaye R (2014) Characterization of tau oligomeric seeds in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol Comm* 2:73.
- Gerson JE, Kaye R (2013) Formation and propagation of Tau oligomeric seeds. *Front Neurol* 4:93.
- Ghoshal N, García-Sierra F, Wu J, Leurgans S, Bennett D, Berry R, Binder L (2002) Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 177:475-493.

- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1983-1987.
- Goldblum D, Kipfer-Kauer A, Sarra G, Wolf S, Frueh B (2007) Distribution of amyloid precursor protein and amyloid-beta immunoreactivity in DBA/2J glaucomatous mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:5085-5090.
- Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon J, Petersen R, Parisi J, Hyman B (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24.
- Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, Ferrari G, Russo-Marie F, Sillito AM, Cheetham ME, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF (2007) Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13444-13449.
- Guo Y, Johnson EC, Cepurna WO, Dyck JA, Doser T, Morrison JC (2011) Early gene expression changes in the retinal ganglion cell layer of a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1460-1473.
- Gupta N, Fong J, Ang L, Yucel Y (2008) Retinal tau pathology in human glaucomas. *Can J Ophthalmol* 43:53-60.
- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Molecular Med* 15:112-119.
- Himmelstein DS, Ward SM, Lancia JK, Patterson KR, Binder LI (2012) Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease. *Pharmacol Ther* 136:8-22.
- Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA (1986) Optic-nerve degeneration in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 315:485-487.



- Ito Y, Shimazawa M, Tsuruma K, Mayama C, Ishii K, Onoe H, Aihara M, Araie M, Hara H (2012) Induction of amyloid- $\beta$ (1-42) in the retina and optic nerve head of chronic ocular hypertensive monkeys. *Mol Vis* 18:2647-2657.
- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (2010) Dendritic function of tau mediates amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142:387-397.
- Jackson GR, Owsley C (2003) Visual dysfunction, neurodegenerative diseases, and aging. *Neurol Clin* 21:709-728.
- Kanai Y, Hirokawa N (1995) Sorting mechanisms of Tau and MAP2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron* 14:421-432.
- Katz B, Rimmer S (1989) Ophthalmologic manifestations of Alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol* 34:31-43.
- Kipfer-Kauer A, McKinnon SJ, Frueh BE, Goldblum D (2010) Distribution of amyloid precursor protein and amyloid- $\beta$  in ocular hypertensive C57BL/6 mouse eyes. *Curr Eye Res* 35:828-834.
- Kosik K, Finch E (1987) MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci* 7:3142-3153.
- Kuszczyk M, Gordon-Krajcer W, Lazarewicz JW (2009) Homocysteine-induced acute excitotoxicity in cerebellar granule cells *in vitro* is accompanied by PP2A-mediated dephosphorylation of tau. *Neurochem Int* 55:174-180.

- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C (2010) Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* 189:945-954.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muñoz MJ, Jackson GR, Kaye R (2010) Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry* 49:10039-10041.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, Kaye R (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J* 26:1946-1959.
- Lee AG, Martin CO (2004) Neuro-ophthalmic findings in the visual variant of Alzheimer's disease. *Ophthalmology* 111:376-380; discussion 380-371.
- Leger F, Fernagut P, Canron M, Léoni S, Vital C, Tison F, Bezard E, Vital A (2011) Protein aggregation in the aging retina. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:63-68.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.
- Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E (2003) Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* 121:48 - 56.
- Levy SF, LeBoeuf AC, Massie MR, Jordan MA, Wilson L, Feinstein SC (2005) Three- and four-repeat tau regulate the dynamic instability of two distinct microtubule subpopulations in qualitatively different manners: Implications for neurodegeneration. *J Biol Chem* 280:13520-13528.

- Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, Duff K (2012) Trans-synaptic spread of tau pathology *in vivo*. PLoS ONE 7:e31302.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2006) Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. Neurosci Res 54:197-201.
- Mailliot C, Podevin-Dimster V, Rosenthal R, Sergeant N, Delacourte A, Fiskum G, Buée L (2000) Rapid tau protein dephosphorylation and differential rephosphorylation during cardiac arrest-induced cerebral ischemia and reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab 20:543-549.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. Proc Natl Acad Sci USA 91:1632-1636.
- McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, Tahzib NG, Reitsamer HA, Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Zack DJ (2002) Caspase activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:1077-1087.
- Migheli A, Butler M, Brown K, Shelanski M (1988) Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. J Neurosci 8:1846-1851.
- Mohamed N-V, Plouffe V, Rémillard-Labrosse G, Planel E, Leclerc N (2014) Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. Sci Rep 4:5715.

- Morawe T, Hiebel C, Kern A, Behl C (2012) Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 46:41-54.
- Morquette B, Morquette P, Agostinone J, Feinstein E, McKinney RA, Kolta A, Di Polo A (2015) REDD2-mediated inhibition of mTOR promotes dendrite retraction induced by axonal injury. *Cell Death Differ* 22:612-625.
- Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC (2015) Modeling glaucoma in rats by sclerosing aqueous outflow pathways to elevate intraocular pressure. *Exp Eye Res* 141:23-32.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC (1997) A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 64:85-96.
- Nadal-Nicolas F, Jimenez-Lopez M, Sobrado Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas Navarro M, Vidal Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3860-3868.
- Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martínez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3860-3868.
- Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SWM (2012) Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Ann Rev Neurosci* 35:153-179.
- Noble W, Hanger D, Gallo J (2010) Transgenic mouse models of tauopathy in drug discovery. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:403-428.

- Nucci C, Martucci A, Martorana A, Sancesario GM, Cerulli L (2011) Glaucoma progression associated with altered cerebral spinal fluid levels of amyloid beta and tau proteins. *Clin Experiment Ophthalmol* 39:279-281.
- Oblinger M, Argasinski A, Wong J, Kosik K (1991) Tau gene expression in rat sensory neurons during development and regeneration. *J Neurosci* 11:2453-2459.
- Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2015) Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res* 132:17-33.
- Otvos LJ, Feiner L, Lang E, Szendrei G, Goedert M, Lee V (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 39:669-673.
- Pang J-J, Frankfort BJ, Gross RL, Wu SM (2015) Elevated intraocular pressure decreases response sensitivity of inner retinal neurons in experimental glaucoma mice. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Patterson KR, Remmers C, Fu Y, Brooker S, Kanaan NM, Vana L, Ward S, Reyes JF, Philibert K, Glucksman MJ, Binder LI (2011) Characterization of prefibrillar tau oligomers *in vitro* and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286:23063-23076.
- Pernet V, Di Polo A (2006) Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy *in vivo*. *Brain* 129:1014-1026.

- Perry VH (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neurosci* 6:931-944.
- Petry FR, Pelletier J, Bretteville A, Morin F, Calon F, Hébert SS, Whittington RA, Planel E (2014) Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and solutions. *PLoS ONE* 9:e94251.
- Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui D-H, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2401-2411.
- Plouffe V, Mohamed NV, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M, Leclerc N (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PLoS One* 7:e36873.
- Pooler AM, Phillips EC, Lau DHW, Noble W, Hanger DP (2013) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 14:389-394.
- Quigley HA (2011) Glaucoma. *Lancet* 377:1367-1377.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364-6369.
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu G-Q, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid  $\beta$ -induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.
- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu G-Q, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L (2011) Amyloid- $\beta$ /Fyn-induced synaptic,

network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:700-711.

Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen S-H, Takashima A (2007) Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci* 25:3020-3029.

Salt TE, Nizari S, Cordeiro MF, Russ H, Danysz W (2014) Effect of the A $\beta$  Aggregation Modulator MRZ-99030 on Retinal Damage in an Animal Model of Glaucoma. *Neurotox Res* 26:440-446.

SantaCruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.

Scholz T, Mandelkow E (2014) Transport and diffusion of tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci* 71:3139-3150.

Schön C, Hoffmann NA, Ochs SM, Burgold S, Filser S, Steinbach S, Seeliger MW, Arzberger T, Goedert M, Kretzschmar HA, Schmidt B, Herms J (2012) Long-term *in vivo* imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS ONE* 7:e53547.

Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buée L (2008) Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5:207-224.

- Shackelford D, Yeh R (1998) Dephosphorylation of tau during transient forebrain ischemia in the rat. *Mol Chem Neuropathol* 34:103-120.
- Shackelford DA, Nelson KE (1996) Changes in phosphorylation of  $\tau$  during ischemia and reperfusion in the rabbit spinal cord. *J Neurochem* 66:286-295.
- Sit AJ (2014) Intraocular pressure variations: causes and clinical significance. *Can J Ophthalmol* 49:484-488.
- Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT (2006) Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* 168:1598-1607.
- Tepper K, Biernat J, Kumar S, Wegmann S, Timm T, Hübschmann S, Redecke L, Mandelkow E-M, Müller DJ, Mandelkow E (2014) Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells. *J Biol Chem* 289:34389-34407.
- Terry R (2000) Do neuronal inclusions kill the cell? *J Neural Transm Suppl* 59:91-93.
- Tham Y-C, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng C-Y (2014) Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 121:2081-2090.
- van de Nes JAP, Nafe R, Schlote W (2008) Non-tau based neuronal degeneration in Alzheimer's disease — an immunocytochemical and quantitative study in the supragranular layers of the middle temporal neocortex. *Brain Res* 1213:152-165.
- Vidal-Sanz M, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2015) Retinal



- neurodegeneration in experimental glaucoma. In: Prog Brain Res (Giacinto B, Carlo N, eds), pp 1-35: Elsevier.
- Vogt BA, Vogt LJ, Vrana KE, Gioia L, Meadows RS, Challa VR, Hof PR, Van Hoesen GW (1998) Multivariate analysis of laminar patterns of neurodegeneration in posterior cingulate cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 153:8-22.
- Wilson AM, Di Polo A (2012) Gene therapy for retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Gene Ther* 19:127-136.
- Wilson AM, Chiodo VA, Boye SL, Brecha NC, Hauswirth WW, Di Polo A (2014) Inhibitor of Apoptosis-Stimulating Protein of p53 (iASPP) Is Required for Neuronal Survival after Axonal Injury. *PLoS ONE* 9:e94175.
- Wilson AM, Morquette B, Abdouh M, Unsain N, Barker PA, Feinstein E, Bernier G, Di Polo A (2013) ASPP1/2 Regulate p53-Dependent Death of Retinal Ganglion Cells through PUMA and Fas/CD95 Activation *In vivo*. *J Neurosci* 33:2205-2216.
- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293:711-714.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 23:2284-2293.
- Yoneda S, Hara H, Hirata A, Fukushima M, Inomata Y, Tanihara H (2005) Vitreous fluid levels of  $\beta$ -amyloid (1–42) and tau in patients with retinal diseases. *Jpn J Ophthalmol* 49:106-108.

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang S-M, Iwata N, Saido Takaomi C, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VMY (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53:337-351.

Zempel H, Mandelkow E (2014) Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci* 37:721-732.

Zempel H, Luedtke J, Kumar Y, Biernat J, Dawson H, Mandelkow E, Mandelkow EM (2013) Amyloid- $\beta$  oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TLL6 and spastin. *EMBO J* 32:2920-2937.

### 3.7. FIGURES

**FIGURE 1. Age modulates the expression and phosphorylation profile of retinal tau.**

A, Representative Western blots of soluble retinal extracts from 2- and 8-month-old Brown Norway rats probed with an antibody against total tau (K9JA) demonstrated the presence of three predominant tau isoforms of 50, 55, and 100 kDa. B, Densitometric analysis showed a 1.7-fold and 2.8-fold increase in the 50 and 100 kDa tau variants, respectively, in samples from 8-month-old animals (N = 6) compared with younger animals (N = 3 ; Student's t test, \*p < 0.05). C, D, All tau isoforms were observed in Tau<sup>+/+</sup> mouse retinas (N = 3), whereas no signal was detected in Tau<sup>-/-</sup> murine retinal samples (N = 3), validating the specificity of the antibody. E–J, Analysis of phospho-specific tau epitopes demonstrated age-dependent changes in phosphorylation with PHF1 (Ser396, Ser404) and PS199 (Ser199), while no change was detected with AT8 (Ser202, Thr205 ; 8 month-old, N = 6 ; 2 month-old, N = 3 ; Student's t test, \*p < 0.05). Vertical lines represent nonconsecutive samples from the same gel.

**FIGURE 2. Ocular hypertension promotes retinal tau upregulation and epitope-dependent changes in phosphorylation.**

A, Intraocular pressure (IOP) measurements for individual rats during a 3 week period following injection of hypertonic saline solution into an episcleral vein (Intact, N = 10; OHT, N = 14). B, Western blot analysis showed a substantial increase in all tau isoforms in retinas with OHT compared with Intact controls. Two examples of retinas with OHT are shown, using different samples and exposure times, to better demonstrate the

independent increase of the 50 and 55 kDa bands. C, Densitometry demonstrated a 3.2-fold, 3.4-fold, and 4.9-fold increase in the 50, 55, and 100 kDa bands, respectively, in glaucomatous retinas compared with Intact controls (OHT, N = 10 ; Intact, N = 6 ; Student's t test, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001). D, Real-time qPCR analysis demonstrated no significant change in retinal tau gene expression (OHT, N = 6 ; Intact, N = 6). E–G, Western blot analysis of phospho-specific epitopes revealed alterations in tau phosphorylation at PHF1 and PS199, while no change was detected at AT8. H–J, Densitometric analysis demonstrated a significant increase in phosphorylation on S396 and S404 (PHF1), accompanied by reduced phosphorylation on S199 (PS199) relative to total tau, while no change was detected on AT8 (OHT, N = 9– 10/group ; Intact, N = 6 ; Student's t test, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01). Vertical lines represent nonconsecutive samples from the same gel.

**FIGURE 3. Altered phosphorylation drives tau accumulation and oligomerization in glaucomatous retinas.**

A, Pearson correlation analysis of 100 kDa/total tau vs total tau demonstrated a positive association between the levels of the 50 kDa species and the 100 kDa/50 kDa ratio. B, No significant correlation was observed between the levels of the 55 kDa species and the 100 kDa/55 kDa ratio. C, D, Analysis of phosphorylated tau/total tau vs total tau showed that phosphorylation of the PHF1 epitope (S396, S404) correlated positively with 50 kDa tau accumulation, while no significant correlation was found for 55 kDa tau. E, F, A negative correlation was found between S199 phosphorylation on 50 and 55 kDa tau and their levels. R, correlation coefficient. N = 9/group. G, H, Western blot analysis of retinal

extracts in nondenaturing conditions using T22, an antibody that recognizes tau oligomers, confirmed the appearance of tau oligomeric complexes in glaucomatous retinas (OHT, N = 5 ; Intact, N = 3 ; Student's t test, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001). Vertical lines represent nonconsecutive samples from the same gel.

**FIGURE 4. Tau accumulates in the RGC somatodendritic compartment in glaucoma.**

A, B, Retinal immunohistochemistry using antibodies against total tau (K9JA) revealed marked tau upregulation in glaucomatous eyes compared with Intact controls. C–E, Colabeling of hypertensive retinas with total tau and TUJ1, an RGC-specific marker, demonstrated tau upregulation in RGC soma in the GCL and dendrites in the IPL. F–H, Confocal microscopy analysis validated tau protein expression in RGC somas and dendrites (arrowhead). I–Q, In the INL, cells expressing tau were identified as calbindin-positive horizontal cells, ChAT-positive amacrine cells, and PKC $\alpha$ -positive bipolar cells (white arrowheads). Scale bars : A–E, 25  $\mu$ m ; F–H, 5  $\mu$ m ; I–Q, 12.5  $\mu$ m. ONL, Outer nuclear layer

**FIGURE 5. Tau is downregulated in optic nerve RGC axons in glaucoma.**

A–F, Tau is abundantly expressed in RGC axons, visualized with the axonal-enriched marker NF-H, in control normotensive eyes. G–L, In contrast, optic nerves with OHT displayed a striking reduction in tau protein expression. Tau downregulation was not due to axonal loss because colabeling with NF-H confirmed that RGC axons were still abundant at this time point. Scale bars : A–C, G–I, 25  $\mu$ m ; D–F, J–L, 5  $\mu$ m. M, N,

Western blot analysis of optic nerve homogenates showed a substantial decrease in total tau in nerves from glaucomatous eyes compared with Intact controls. OHT, N = 3 ; Intact, N = 3 ; Student's t test, \*p < 0.05. Vertical lines represent nonconsecutive samples from the same gel. O–T, Immunolabeling of whole-mounted retinas with tau and NF-H antibodies shows low levels of tau in RGC intraretinal axons of naive retinas that increased markedly with OHT. Scale bars : O–T, 25  $\mu$ m.

**FIGURE 6. Intravitreal delivery of siRNA against tau downregulates retinal tau protein levels.**

A, B, Western blot analysis of retinal homogenates from eyes that received siRNA at 1 week after the induction of OHT. Eyes injected with siTau showed a significant reduction in tau protein, while a control siGFP had no effect (siGFP, N = 4; siTau, N = 3; Student's t test, \*p < 0.05). Vertical lines represent nonconsecutive samples from the same gel. C, D, Results of immunohistochemistry of glaucomatous retinas confirmed that tau downregulation occurred primarily in the IPL and GCL following siTau administration. No change was observed with control siGFP. Scale bars, 25  $\mu$ m. ONL, Outer nuclear layer.

**FIGURE 7. Selective tau knockdown promotes RGC survival.**

A–C, Flat-mounted retinas from eyes treated with siTau displayed higher RGC densities, visualized with the RGC-specific marker Brn3a, compared with control retinas treated with vehicle at 3 weeks after OHT. Scale bars, 25  $\mu$ m. D–F, Optic nerves from siTau-treated eyes contained more RGC axon fibers with normal morphology, visualized in

Toluidine Blue-stained cross sections, compared with control eyes. Scale bars, 5  $\mu$ m. G, H, Quantitative analysis confirmed that siTau (black bars) promoted significant survival of RGC somas (N = 10) and axons (N = 6) compared with control eyes treated with siGFP (gray bars ; somas, N = 9 ; axons, N = 6). The densities of RGC somas and axons in Intact, nonglaucomatous Brown Norway rat retinas are shown as reference (white bars ; 100 % survival, N = 6). Intraocular injection of siTau did not significantly alter the density of RGC somas or axons in naive animals (light gray bars, N = 4). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Overall ANOVA for RGC somas,  $p < 0.001$  ; Bonferroni post hoc test, nontreated Intact vs Intact + siTau,  $p > 0.05$  ; nontreated Intact vs OHT + siGFP,  $***p < 0.001$  ; OHT + siGFP vs OHT + siTau,  $***p < 0.001$ . Overall ANOVA for RGC axons,  $p < 0.001$  ; Bonferroni post hoc test, nontreated Intact vs Intact + siTau,  $p > 0.05$  ; nontreated Intact vs OHT + siGFP,  $***p < 0.001$  ; OHT + siGFP vs OHT + siTau,  $*p < 0.05$ . n.s., Not significant.

### 3.8. TABLE

**Table 1. Role of Tau on RGC survival in glaucoma**

Treatment	RGC soma/mm <sup>2</sup>			RGC axons/optic nerve		
	N	Mean ± S.E.M.	%	N	Mean ± S.E.M.	%
Intact	6	2,127 ± 81	100	6	102,783 ± 3,623	100
Intact + Anti-Tau siRNA	4	2,013 ± 60	95	4	95,418 ± 3,557	93
Anti-GFP siRNA	9	1,599 ± 40	75	6	58,083 ± 6,246	57
Anti-Tau siRNA	10	1,966 ± 39	92	6	79,701 ± 4,606	78

**TABLE 1.** Tau knockdown promotes RGC soma and axon survival. Values are expressed as mean ± S.E.M. Intact, non-treated, non-injured control retinas or optic nerves are used as reference (100 %).



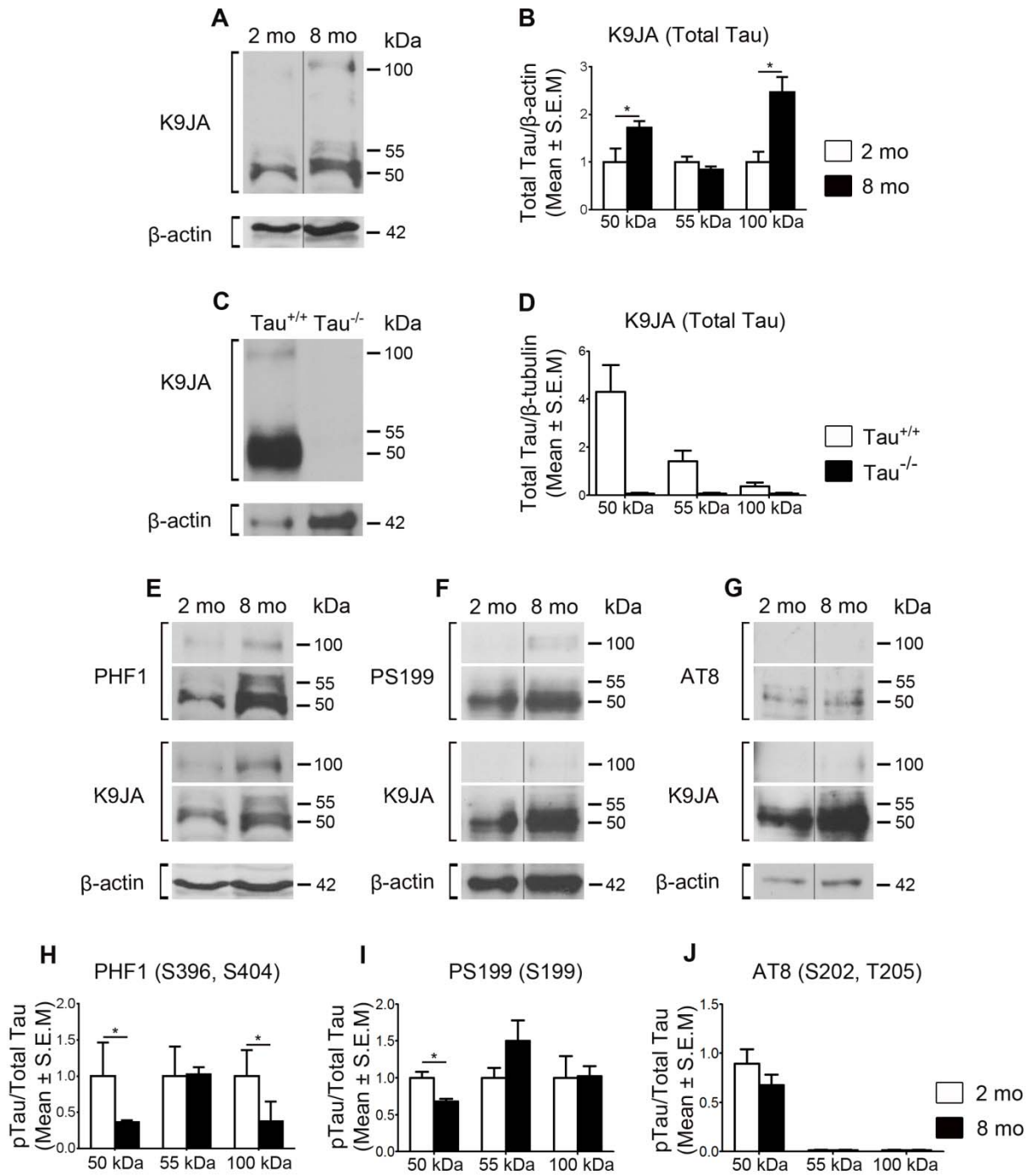


Figure 1

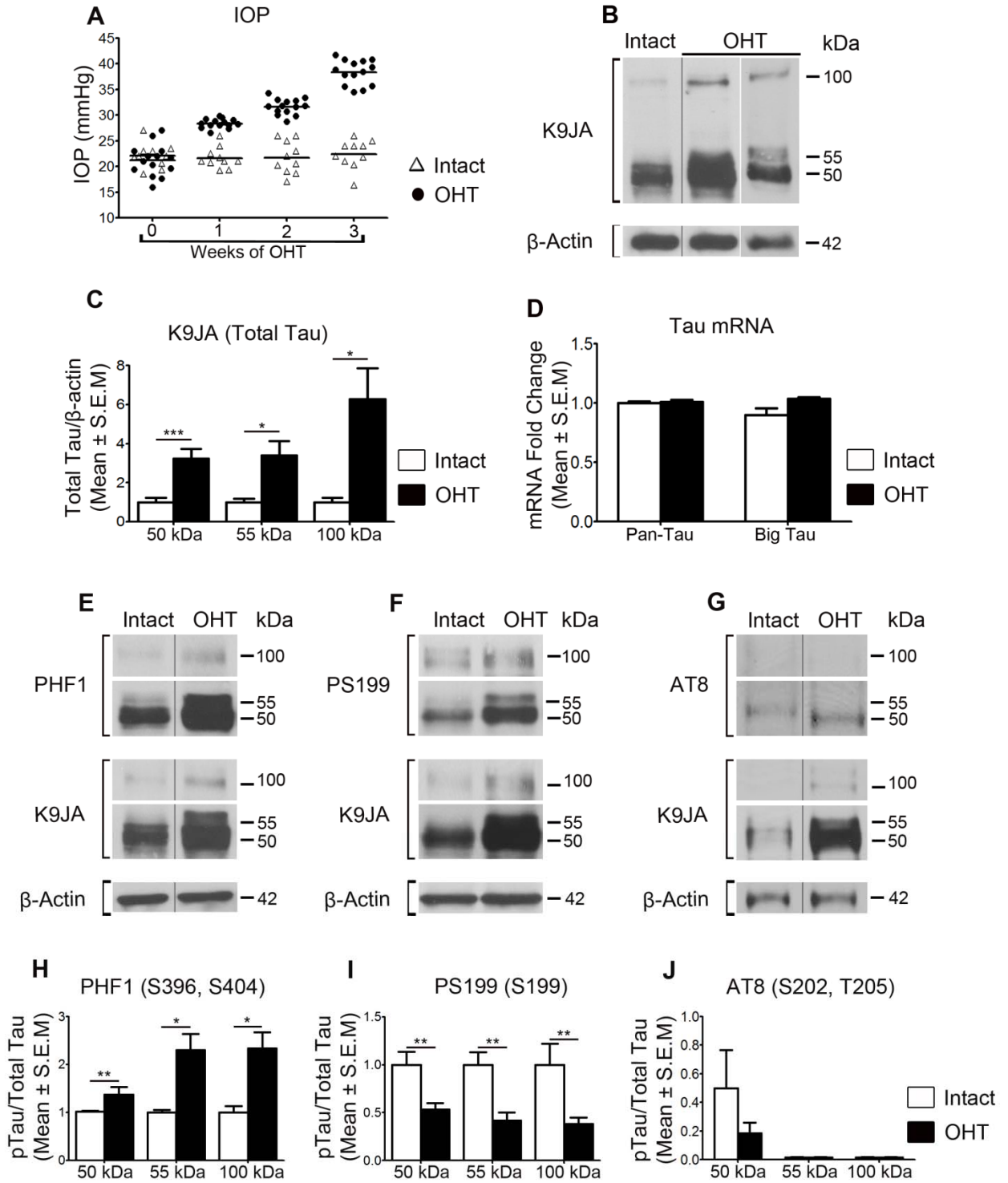


Figure 2

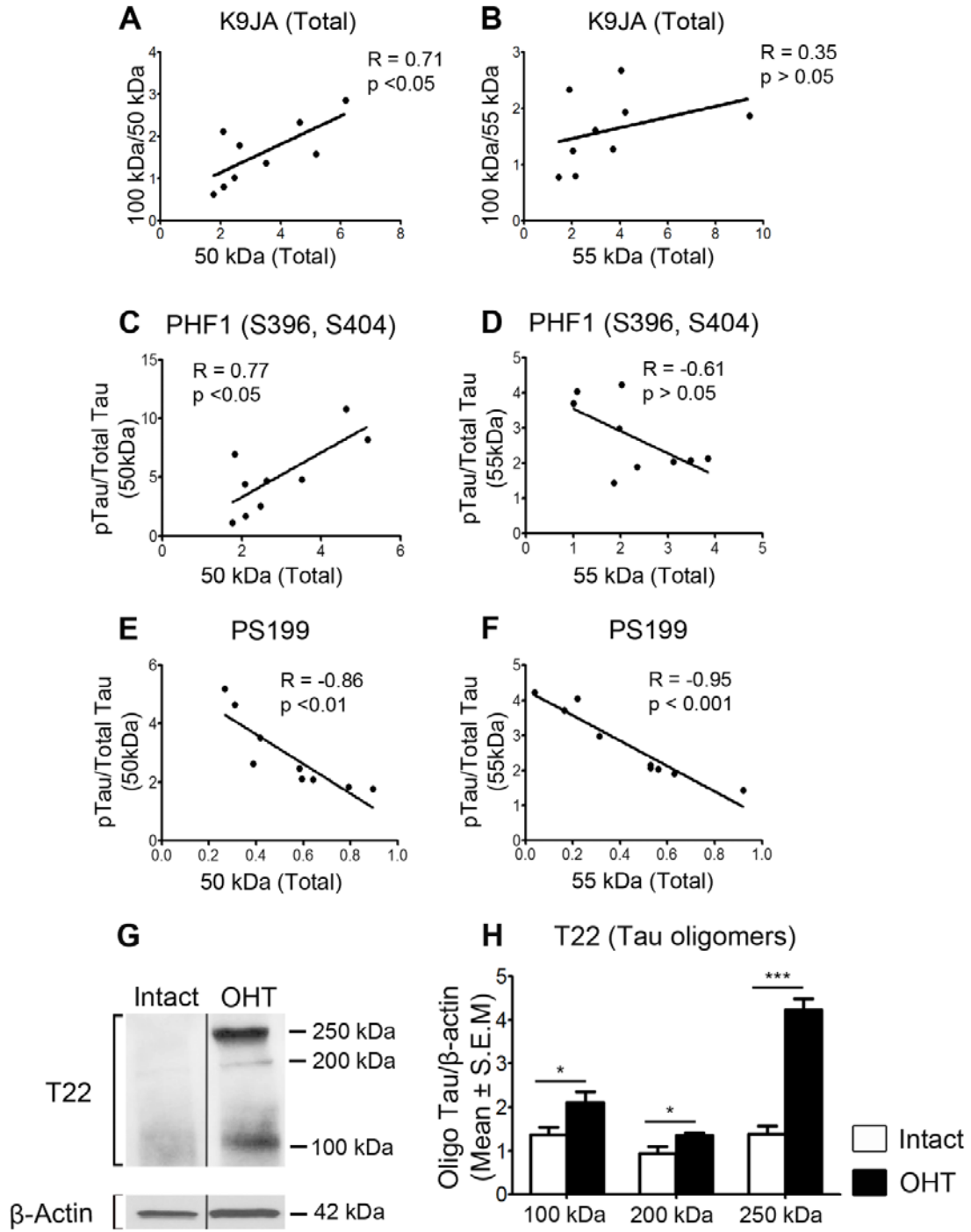


Figure 3

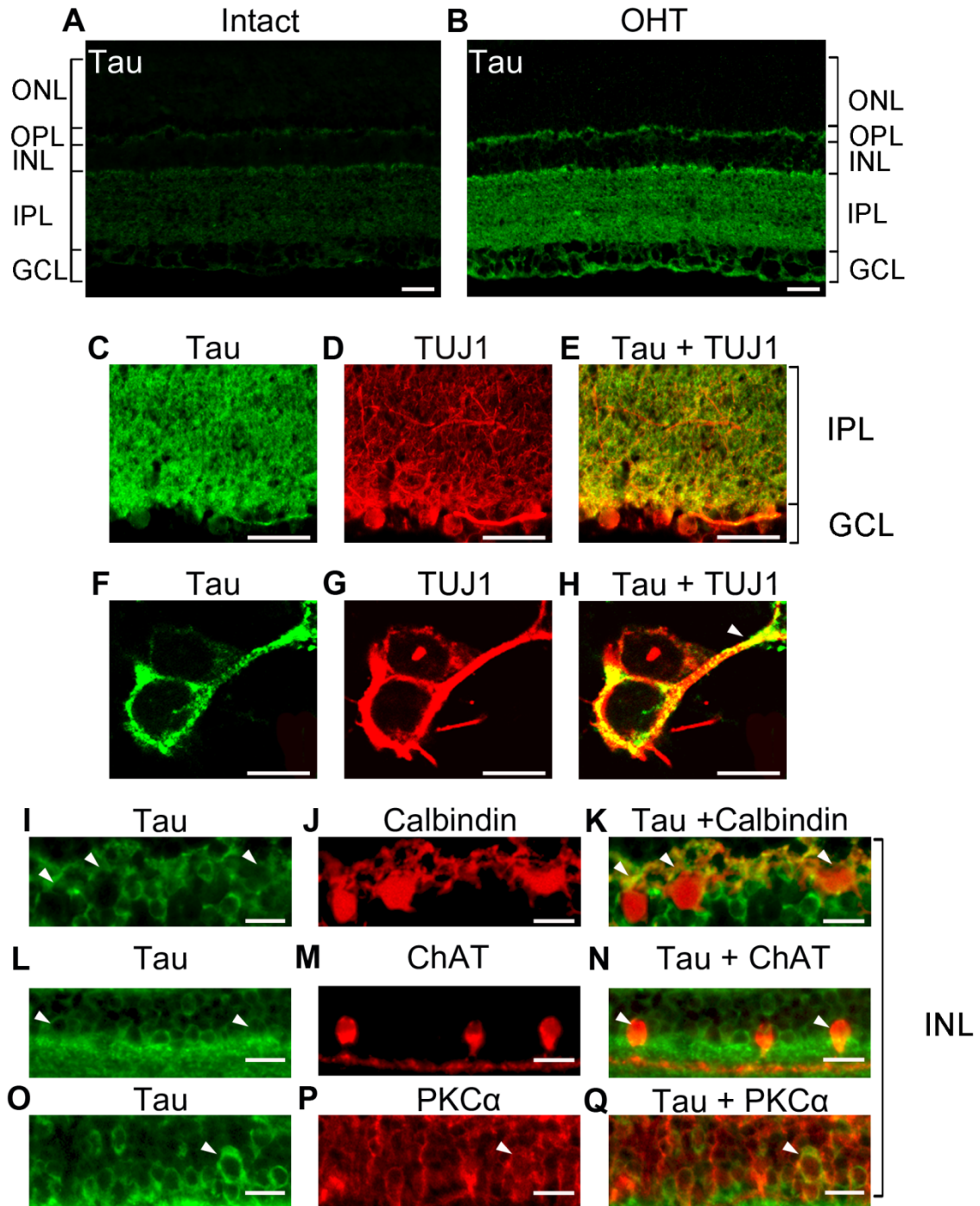


Figure 4

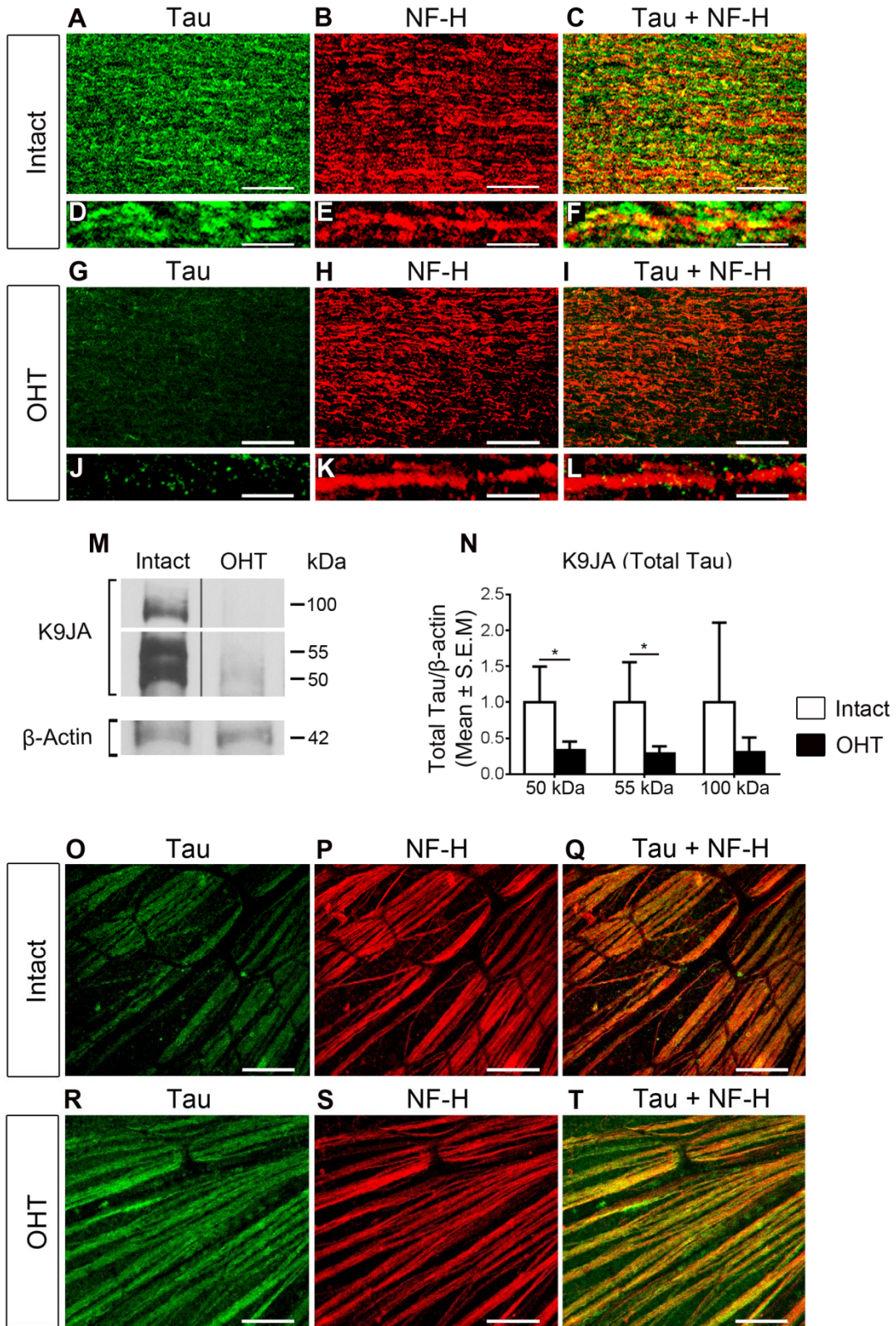


Figure 5



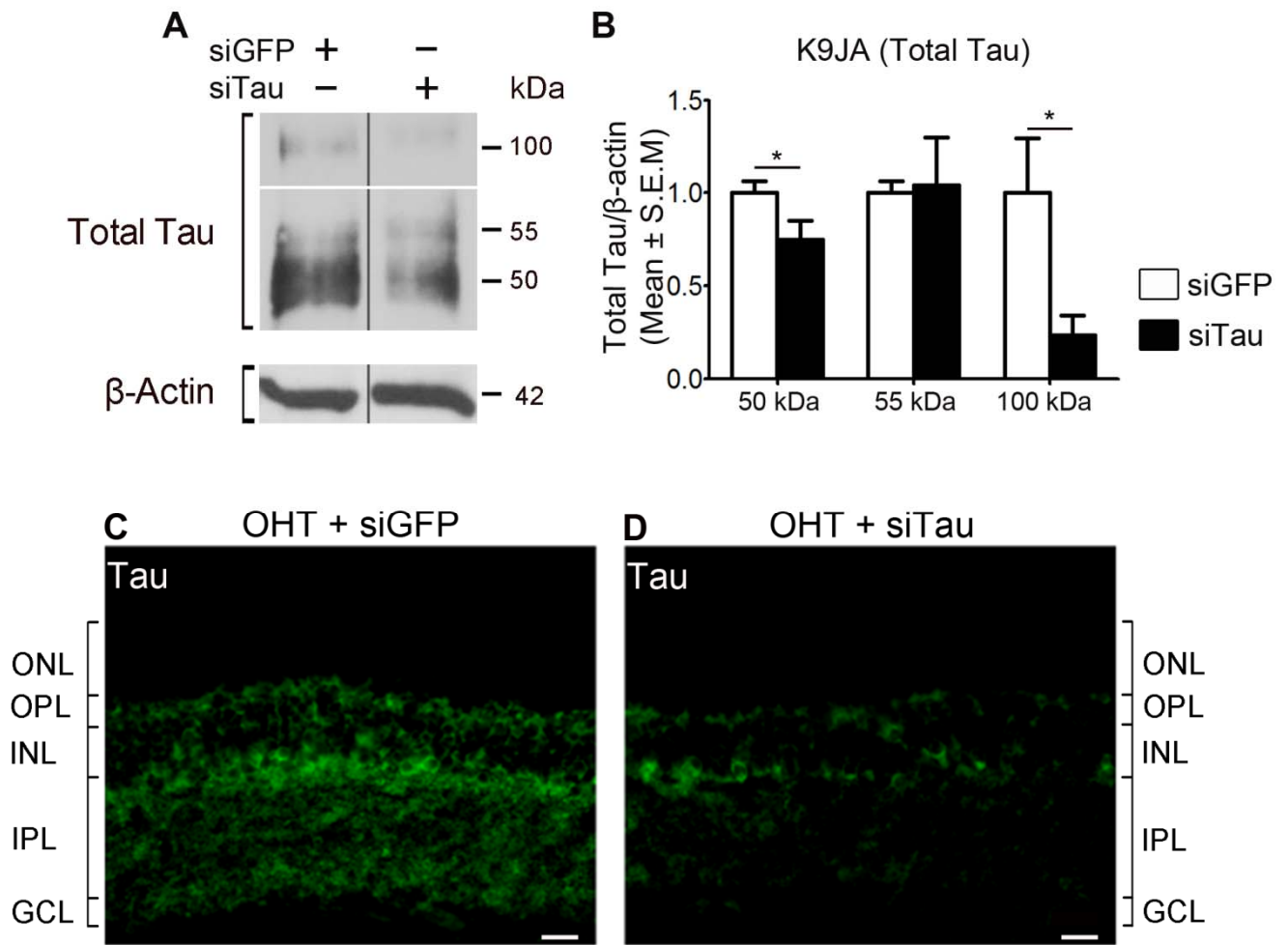


Figure 6

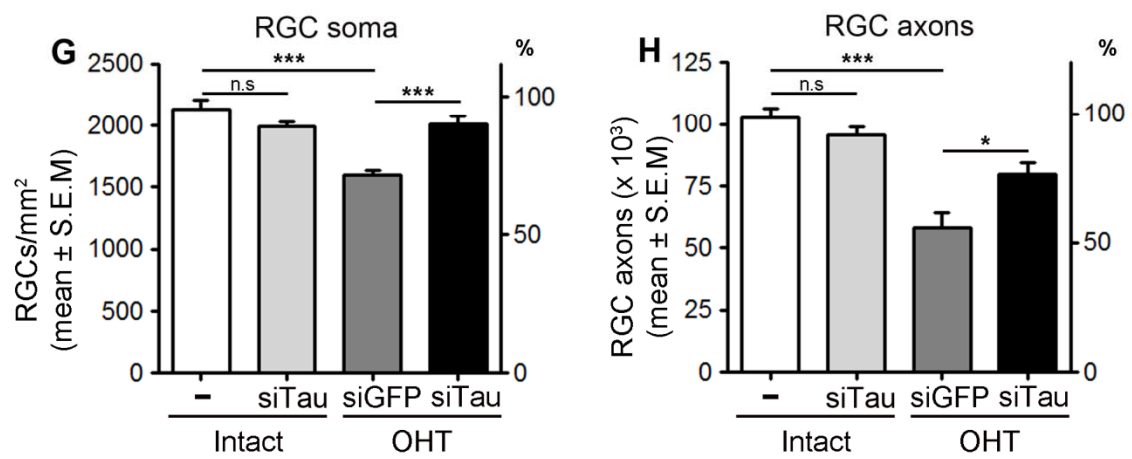
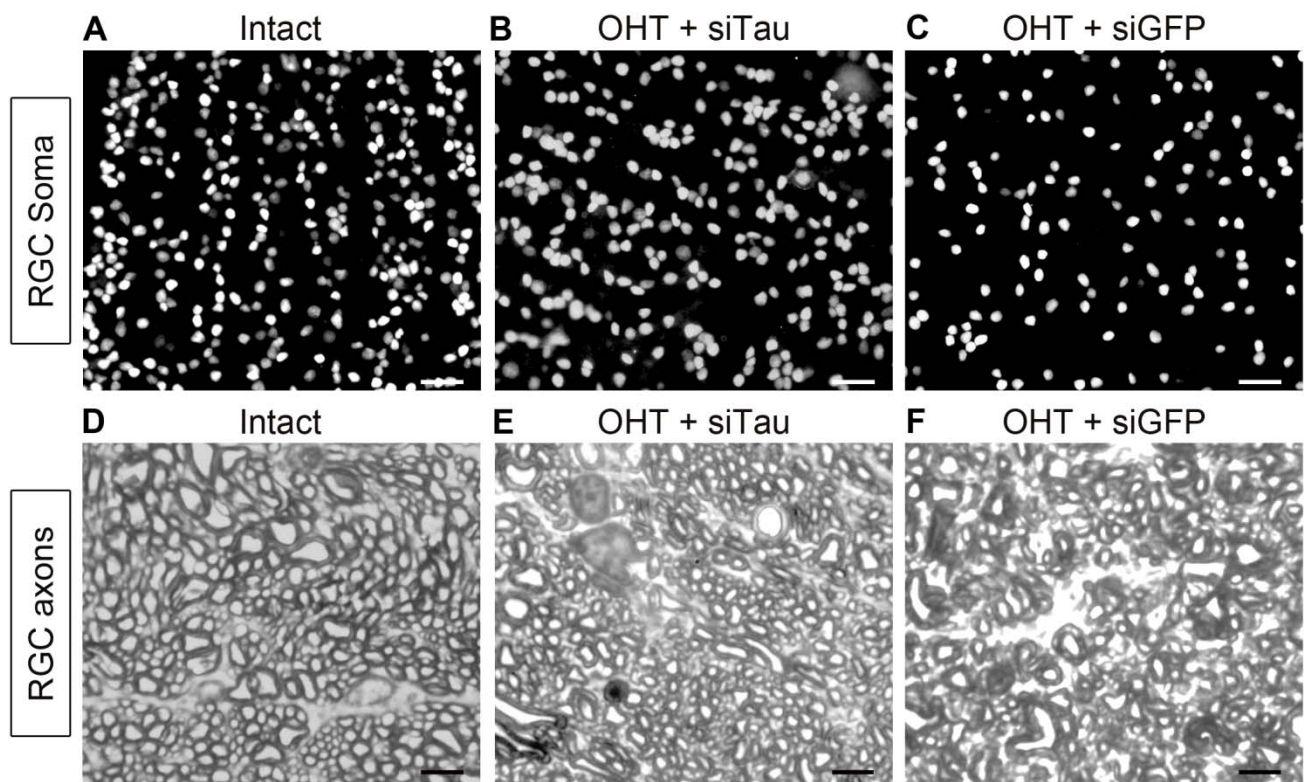


Figure 7

Chapitre IV.

Second article

**Tau accumulation in the retina of a murine model of Alzheimer's disease precedes brain pathology and promotes retinal ganglion cell dysfunction**

Abbreviated title: Tau-mediated retinal ganglion cell pathology in Alzheimer's disease

**Marius Chiasseu<sup>1</sup>, Luis Alarcon-Martinez<sup>1</sup>, Florence Dotigny<sup>1</sup>, Laurie Destroismaisons<sup>1</sup>, Christine Vande Velde<sup>1</sup>, Adriana Di Polo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Neuroscience and Centre de recherche du centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal, Montreal, QC H2X 0A9, Canada

Corresponding author: Adriana Di Polo, Ph.D.  
Department of Neuroscience  
University of Montreal  
CRCHUM, 900 Rue Saint-Denis  
Tour Viger, Room R09.720  
Montreal, Quebec H2X 0A9, Canada  
Email: [adriana.di.polo@umontreal.ca](mailto:adriana.di.polo@umontreal.ca)

**Keywords:** Alzheimer's disease, anterograde transport, retinal ganglion cells, tau, neurotoxicity



## **4.1. ABSTRACT**

### **Background**

Tau is an axonal-enriched protein that binds to and stabilizes microtubules, thus playing a crucial role in the maintenance and function of neurons. In Alzheimer's disease and other tauopathies, abnormal tau phosphorylation and missorting strongly correlates with neuronal loss and cognitive decline. Substantial visual deficits are found in individuals affected by Alzheimer's disease including a preferential loss of retinal ganglion cells (RGCs), neurons with long projecting axons that convey visual information from the retina to the brain. However, the molecular mechanisms that underlie visual deficits in Alzheimer's disease are poorly understood. Here, we characterize major pathological alterations in the retina and visual pathways associated with neuronal dysfunction in a murine model of Alzheimer's disease.

### **Results**

Our data demonstrate an age-related increase in endogenous retinal tau characterized by epitope-specific hyper- and hypo-phosphorylation in PS1M146V, APPSWE, TauP301L mutant mice (3xTg). Retinal tau accumulation was observed as early as three months of age, prior to the onset of behavioural deficits, and preceded tau aggregation in the brain. Intriguingly, tau accumulation was primarily observed in RGC dendrites and intraretinal axons, while tau in optic nerve axons was virtually depleted. More importantly, tau phosphorylation changes and missorting resulted in substantial defects in anterograde axonal transport and age-dependent RGC neurodegeneration.

### **Conclusions**

This study reveals early and profound alterations in retinal tau associated with neuronal dysfunction and suggests a prominent role for pathological tau in visual deficits in Alzheimer's disease.

## 4.2. BACKGROUND

Tau, a member of the microtubule-associated protein family, plays a crucial role in many neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD), corticobasal dementia, frontotemporal lobar degeneration, progressive supranuclear palsy, and glaucoma (Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986; Cairns et al., 2007; Chiasseu et al., 2016). These disorders share similar features including abnormal tau phosphorylation (Drewes et al., 1995; Kimura et al., 1996; Mailliot et al., 1998), protein aggregation (Alonso et al., 1996; Mailliot et al., 1998), neurofibrillary tangle formation (Braak and Braak, 1995; Feany et al., 1996), and neurotoxicity (Stamer et al., 2002; Kraemer et al., 2003; Oddo et al., 2003b; Chiasseu et al., 2016). Tau dysfunction has been well described in AD, the principal cause of dementia worldwide (Ballatore et al., 2007b; Gendreau and Hall, 2013), and occurs several decades before the appearance of cognitive deficits (Morsch et al., 1999; Carrillo et al., 2013). At present, little is known about the early sequence of events leading to tau pathology in AD, highlighting the need to elucidate the interplay of molecular and cellular changes during the pre-symptomatic stages of the disease.

The retina is an integral part of the central nervous system (CNS) and has long been considered a window to the brain. The signal produced by light-sensitive photoreceptors is transmitted to bipolar cells and then to retinal ganglion cells (RGCs), which send information via their axons in the optic nerve to visual centers in the brain (Masland, 2012). As an integral part of the CNS, it is no surprise that the retina is affected by the same neurodegenerative processes that disturb brain function (Javaid et al., 2016). Indeed, substantial visual deficits including impaired contrast sensitivity, reduced visual acuity and abnormal motion perception are found in AD patients, and these correlate tightly with the severity of cognitive and behavioural defects

(Hinton et al., 1986; Blanks et al., 1989; Katz and Rimmer, 1989; Uhlmann et al., 1991; Cronin-Golomb, 1995; Cronin-Golomb et al., 1995; Mendola et al., 1995; Rizzo et al., 2000; Jackson and Owsley, 2003; Lee and Martin, 2004; Cronin-Golomb et al., 2007). Morphological and functional impairments have also been described in the retina of individuals suffering from AD including preferential RGC loss and thinning of the retinal nerve fiber layer (Blanks et al., 1996b; Blanks et al., 1996a; Paquet et al., 2007; Kesler et al., 2011), abnormal electroretinogram response (Parisi et al., 2001), and reduced blood flow (Cheung et al., 2014; Williams et al., 2015).

Similar to the brain, tau inclusions and amyloid beta (A $\beta$ ) deposition have been described in the retina of AD patients and in animal models of the disease (Ning et al., 2008; Liu et al., 2009; Gasparini et al., 2011; Schon et al., 2012; Gupta et al., 2016). Transgenic mice carrying the human P301S tau mutation contain tau aggregates in the retina (Schön et al., 2012), and display RGC functional deficits, increased susceptibility to excitotoxic damage, and altered neurotrophic factor signaling (Bull et al., 2012; Mazzaro et al., 2016). We recently reported key pathological changes of endogenous tau in glaucoma, an optic neuropathy characterized by selective RGC death and the leading cause of irreversible blindness globally (Chiasseu et al., 2016). Ocular hypertension, a major risk factor in glaucoma, triggered substantial tau changes reminiscent of AD including abnormal phosphorylation, missorting, and neurotoxicity (Chiasseu et al., 2016). Collectively, these findings suggest an association between tau alterations and retinal dysfunction, notably linked to RGC damage.

At present, a detailed characterization of the biochemical changes and cellular distribution of endogenous retinal tau and its impact on RGC function and survival during the early presymptomatic and prodromal stages of AD is lacking. To address this, we used the triple

transgenic AD mouse model carrying the human PS1<sup>M146V</sup>, APP<sup>SWE</sup>, Tau<sup>P301L</sup> mutations (3xTg), which closely recapitulates cardinal features of the disease including the formation of A $\beta$  plaques and neurofibrillary tangles (Oddo et al., 2003b). Our data demonstrate that as early as three months of age and prior to the onset of behavioural deficits, abnormally phosphorylated tau accumulates in the retina of 3xTg mice preceding its aggregation in the brain. Tau accumulation was primarily observed in RGC dendrites and intraretinal axons, while tau in optic nerve axons was markedly reduced. Importantly, tau phosphorylation and missorting resulted in striking defects in anterograde axonal transport and age-dependent RGC neurodegeneration. Our study identifies novel alterations of endogenous retinal tau protein and neuronal dysfunction in the early stages of AD, thus offering the possibility of exploiting tau changes for early detection of disease susceptibility and onset.

## **4.3. METHODS**

### **4.3.1. Experimental animals**

The 3xTg mice bearing the human mutations PS1<sup>M146V</sup>, APP<sup>SWE</sup>, Tau<sup>P301L</sup> (Oddo et al., 2003a), tau knockout mice (strain Mapt-<sup>tm1</sup>[EGFP]Klt/J), and their littermate controls were purchased from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) and maintained in our animal facility until needed. Experiments were performed using 3 or 6 month-old female mice because they exhibit a more severe disease phenotype than their age-matched male counterparts (Carroll et al., 2010). All procedures were performed in compliance with the guidelines of the University of Montreal and the CRCHUM, and the Canadian Council on Animal Care for the Use of Experimental Animals (<http://www.ccac.ca>). The number of animals used in each experiment is indicated in the corresponding figure legend.

#### 4.3.2. Western blot analyses

Whole retinas were isolated and homogenized in ice-cold lysis buffer: 50 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 5 mM Na fluoride, 0.25% Na deoxycholate and 2 mM NaVO<sub>3</sub> supplemented with protease and phosphatase inhibitors. Protein homogenates were centrifuged at 18,000 g for 5 min, and the supernatants were removed and resedimented to yield soluble extracts. Samples in Laemmli buffer were boiled for 5 min, resolved in 4-15% SDS polyacrylamide gradient gels, and transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad Life Science, Mississauga, ON). Blots were incubated in blocking solution (10 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 and 5% milk) (ThermoFisher Scientific, Ottawa, ON) for 1 hr at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with each of the following primary antibodies: total tau (K9JA, 1 µg/ml, Dako North America, Carpinteria, CA), phospho-tau S396-S404 (PHF1, 1:100, gift of P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY), phospho-tau S199 (PS199, 1 µg/ml, Invitrogen, Burlington, ON), phospho-tau S202-T205 (AT8, 0.8 µg/ml, ThermoFisher Scientific), misfolded tau (MC-1 and ALZ-50, 1:100, gift of P. Davies, Albert Einstein College of Medicine, NY), or β-actin (0.5 µg/ml, Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Membranes were washed and incubated in peroxidase-linked donkey anti-mouse or donkey anti-rabbit antibodies (0.5 µg/ml, GE Healthcare, Mississauga, ON). Blots were developed with a chemiluminescence reagent (ECL, Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL) and exposed to X-OMAT imaging film (Eastman Kodak, Rochester, NY). Densitometry was performed using ImageJ software on scanned autoradiographic films obtained from at least three independent western blots each carried out using retinal samples from different groups.

#### **4.3.3. Retina and optic nerve immunohistochemistry**

Animals were perfused with 4% paraformaldehyde and the eyes and optic nerves were rapidly dissected. Tissue was embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN), and retinal (16  $\mu\text{m}$ ) or optic nerve (12  $\mu\text{m}$ ) cryosections were collected onto gelatin-coated slides as described (Pernet and Di Polo, 2006; Wilson et al., 2013). The following primary antibodies were added to retinal or optic nerve sections in blocking solution and incubated overnight at 4°C as described (Planel et al., 2004; Wilson et al., 2014): total tau (K9JA, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Dako), tubulin isoform  $\beta\text{III}$  (TUJ1, 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma Aldrich), or neurofilament H (NF-H, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sternberger Monoclonals, Baltimore, MD). For whole-mounted retinas, tissue was permeabilized overnight at 4°C in blocking solution, rinsed and incubated for 5 days at 4°C in the following primary antibodies: total tau (K9JA, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Dako), RNA-binding protein with multiple splicing (RBPMS, 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PhosphoSolutions, Aurora, CO), or NF-H (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sternberger Monoclonals). Sections or whole retinas were washed and incubated with secondary antibodies: donkey anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 594 and 488 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Life Technologies, Eugene, OR). Fluorescent labeling was observed using the Leica TCS-SP5 confocal microscope (Leica Microsystems Inc., Concord, ON, Canada).

#### **4.3.4. Reverse transcription and quantitative real time PCR (qPCR)**

Total RNA was isolated from individual retinas using the RNEasy Mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA). cDNAs were generated from 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed using TaqMan probes and primers that target exon 5, expressed by all tau isoforms (pan-tau, catalog # Rn01495715), exon 4a specific to big tau (catalog #Rn01495711), or 18S ribosomal RNA as

control (catalog #4308329) (Applied Biosystems, Waltham, MA). Amplification was performed using the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with the following cycle conditions: 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min, 72°C for 1 min. Reactions were run in triplicates for each sample and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula was used for the calculation of differential gene expression.

#### **4.3.5. Axonal transport measurement**

Anterograde axonal transport was assessed by injection of cholera toxin  $\beta$  subunit (CT $\beta$ ) conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Life Technologies) as described previously (Crish et al., 2010; Cueva Vargas et al., 2016). CT $\beta$  is a reliable marker of active transport and has been consistently used to assess RGC anterograde transport to the superior colliculus (Angelucci et al., 1996; Aviles-Trigueros et al., 2003). CT $\beta$  was injected intravitreally using a custom-made sharpened microneedle attached to a Hamilton syringe (1% diluted in sterile PBS, total volume: 2  $\mu$ l). Animals were perfused transcardially with 4% PFA at 24 or 72 hr after CT $\beta$  administration, brains were removed, post-fixed and cryoprotected overnight in 30% sucrose prior to embedding in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories). Serial coronal cryosections of the entire superior colliculus from each animal were obtained using a cryostat (30- $\mu$ m thickness). Nine sections per superior colliculus, from rostral to caudal, were selected using an unbiased systematic stereological sampling method, as described (<http://www.stereology.info/sampling>). Sections were photographed digitally using a fluorescent Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss) and the area of the CT $\beta$  signal in each section was measured using the Imaris MeasurementPro module (Bitplane, South Windsor, CT). The total CT $\beta$  signal in each superior colliculus was calculated using the fractionator method: total CT $\beta$  area =  $\Sigma$ CT $\beta$ section area / ssf x asf x tsf, with a section-sampling fraction (ssf = number of

sections sampled / total sections) of 9/90, an area-sampling fraction ( $asf = [a(\text{frame})] / \text{area x-y step between dissectors}$ ) of 1, and a thick-sampling fraction ( $tsf = \text{frame height} / \text{section thickness}$ ) of 1 (Mouton, 2002). This analysis yielded a representative value of CT $\beta$ -positive area throughout each entire superior colliculus, which was then used to calculate the mean for experimental and control groups. To confirm CT $\beta$  uptake by RGC somata, whole retinas were processed as previously described (Nadal-Nicolás et al., 2009) and then incubated overnight at 4°C with the RGC-specific marker brain-specific homeobox/POU domain protein 3a (Brn3a, 0.27  $\mu\text{g/ml}$ ; C-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by secondary Alexa Fluor 594 anti-goat IgG (1  $\mu\text{g/ml}$ ; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Retinas were rinsed, mounted with the vitreal side up, and visualized using the Zeiss Apotome microscope (Carl Zeiss). The total number of CT $\beta$ -positive and Brn3a-positive neurons was quantified by independent random stereological sampling.

#### **4.3.6. Quantification of RGC soma**

Whole-mounted retinas were prepared as described above and incubated overnight with the RGC-specific marker RBPMS followed by Alexa 594-coupled secondary antibody (2  $\mu\text{g/ml}$ , Life Technologies). Retinas were washed, mounted vitreal side up, and visualized with a Zeiss Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss). Images were acquired with a CCD video camera (Retiga, Qimaging, Burnaby, BC) and analyzed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON). RBPMS-labeled RGCs were counted within 3 square areas at distances of 0.25, 0.625 and 1 mm from the optic disc in each of the 4 retinal quadrants for a total of 12 retinal areas as described by us (Lebrun-Julien et al., 2010; Morquette et al., 2015).

#### **4.3.7. Statistical analyses**



Data analysis and statistics were performed using GraphPad InStat software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) for the Student's *t* test as indicated in the legends.

## **4.4. RESULTS**

### **4.4.1. Tau protein build up in the retina precedes accumulation in the brain**

Visual deficits and pathological changes of the retina have been described in the retina of AD patients (Mendola et al., 1995; Rizzo et al., 2000), therefore we first asked whether the level of endogenous tau was affected in 3xTg mouse retina and its relationship to tau expression in the brain. For this purpose, retinal and brain protein samples from 3- and 6-month-old 3xTg mice were compared to those from age-matched wild-type littermate controls. These time points were selected because they precede the appearance of behavioral or cognitive deficits in this model (Billings et al., 2005; Stover et al., 2015). Western blots of soluble retinal homogenates using an antibody against total tau (K9JA), which binds the microtubule binding domain of the protein irrespective of its phosphorylation state (Biernat et al., 2002; Plouffe et al., 2012), revealed the presence of four predominant tau isoforms of 37-kDa, 50-kDa, 55-kDa and 100-kDa (Fig. 1A). Densitometry analysis showed that all four tau isoforms increased in 3-month-old 3xTg mouse retinas relative to littermate controls (Fig. 1C). Analysis of cortical and hippocampal homogenates revealed the presence of four tau isoforms of 37-kDa 50-kDa, 55-kDa, and 60-kDa (Fig 1B). In contrast to retina, however, the levels of all brain tau isoforms in 3-month-old 3xTg mice were similar to those in age-matched controls (Fig 1D). No signal was detected in retinal or brain samples from tau null mice thus confirming the specificity of the K9JA antibody (Fig. 1A, B). Western blot and densitometry analyses of 6-month-old 3xTg samples revealed a similar increase of the 55-kDa tau isoform both in retina and brain, relative to age-matched controls,

while all other isoforms remained unchanged (Figs. 1E-H). These results demonstrate that retinal tau build up occurs early and precedes both its accumulation in the brain and the appearance of overt cognitive defects.

#### **4.4.2. Retinal tau undergoes epitope-specific and age-dependent phosphorylation changes in AD**

Alterations in tau phosphorylation have been shown to contribute to tau dysfunction in pathological conditions (Buee et al., 2000; Kuret et al., 2005; Ballatore et al., 2007b). Therefore, we analyzed tau phosphorylation in retinal samples from 3xTg mice using the phospho-tau specific antibodies AT8 (S202, T205) (Biernat et al., 1992; Porzig et al., 2007), PS199 (S199) (Dong et al., 2014), and PHF1 (S396, S404) (Greenberg et al., 1992; Otvos et al., 1994). These antibodies were selected because they recognize phospho-specific epitopes that correlate with AD severity (Augustinack et al., 2002). Visualization of western blots probed with AT8, PHF1 or PS199 revealed an increase in phosphorylation at these epitopes in AD retinas (Fig. 2A-C). In 3-month-old 3xTg retinas, densitometric analysis of phospho-tau signals with respect to total tau, which increased at this age, confirmed a higher tau phosphorylation signal on residues S202 and T205 of all isoforms (AT8, Fig. 2A, D), while a relative decrease at residue S199 was observed (PS199: 55-kDa, 100-kDa) (Fig. 2B, E). Conversely, 6-month-old 3xTg retinas displayed reduced phosphorylation with AT8 on all isoforms (Fig. 2G, J), and increased phosphorylation with PS199 (50-kDa, 55-kDa, 100-kDa) (Fig. 2H, K). No significant changes were detected with PHF1 in 3- or 6-month-old 3xTg retinas relative to controls (Fig. 2C, F, I, L). Phosphorylation can lead to changes in the conformation of tau protein during the course of AD, which are thought to play a key role in pathological tau accumulation and cleavage (Garcia-Sierra et al.,

2003; Binder et al., 2005). The conformation of tau in 3xTg retinas was investigated using the antibodies MC-1 and ALZ-50, which recognize the early folding back of the N-terminus on the microtubule domain in a hairclip configuration linked with tau aggregation (Carmel et al., 1996; Jicha et al., 1997; Binder et al., 2005). No changes in the levels of MC-1 or ALZ-50 were detected in 3-month-old (Fig. 3A-D) or 6-month-old (Fig. 3E-H) 3xTg retinas relative to age-matched littermate controls. Collectively, these data demonstrate increased tau phosphorylation at AT8 epitopes in the early presymptomatic stages, whereas increased phosphorylation at PS199 correlates with the later prodromal phase of the disease. We conclude that retinal tau undergoes complex age-related and epitope-specific changes in AD, which are independent of alterations in protein conformation.

#### **4.4.3. Tau accumulates in the RGC somatodendritic compartment and intraretinal axons**

The cellular distribution of tau in the retina was investigated by immunohistochemistry using the K9JA antibody against total tau. In agreement with previous reports (Ho et al., 2015; Chiasseu et al., 2016), a low basal level of tau expression was found in all retinal layers except the outer nuclear layer (Fig. 4A). Consistent with our biochemical findings, retinal tau increased in 3-month-old 3xTg mice and its accumulation was more pronounced in the inner plexiform layer (IPL), where RGC dendrites are located (Fig. 4B). Labeling with an antibody against tubulin isoform  $\beta$ III (TUJ1), an RGC-specific marker that strongly labels the dendrites of these neurons (Cui et al., 2003; Yin et al., 2003), confirmed localization of tau within the dendritic compartment (Fig. 4C-E). Further analysis of tau distribution on flat-mounted retinas using RBPMS, which selectively labels RGC soma (Kwong et al., 2010; Rodriguez et al., 2014),

demonstrated tau accumulation in RGC bodies in 3xTg retinas relative to littermate controls (Fig. 4F-K). A similar distribution of tau was observed in 6-month-old 3xTg mice, with more robust tau build up at this age (Fig. 4L-Q). Analysis of tau expression in the intraretinal, unmyelinated segment of RGC axons was investigated by co-localization of tau with the axonal marker neurofilament-H (NF-H). A low level of tau protein was detected in RGC intraretinal axons, visualized with NF-H, in wild-type retinas (Fig 5A-C). In contrast, a pronounced increase of tau signal in NF-H-positive axons was observed in 3xTg retinas at both 3 (Fig. 5D-F) and 6 months of age (Fig. 5G-L). To investigate whether tau accumulation in the retina resulted from increased gene expression, real-time qPCR analysis was performed using primers that recognize all tau isoforms (pan-tau) and big tau, a high molecular weight isoform (~110 kDa) that has been detected in the peripheral nervous system, spinal cord and retina (Oblinger et al., 1991; Goedert et al., 1992; Boyne et al., 1995). No changes in tau mRNA levels were detected in AD retinas compared to controls (Fig. 5M). These data indicate that tau accumulates early in the AD retina, predominantly in RGC dendrites and intraretinal axons, and it is not the result of gene expression upregulation.

#### **4.4.4. Tau is depleted from RGC axons in 3xTg optic nerves**

In physiological conditions, tau is enriched in axons with low levels found in dendrites and soma (Migheli et al., 1988). In AD and other tauopathies, tau detaches from axonal microtubules and accumulates in the somatodendritic compartment of affected neurons (Ballatore et al., 2007a). To assess whether the distribution of tau in RGC axons within the optic nerve was altered in 3xTg mice, we carried out confocal imaging of nerve cross sections co-labeled with tau and the axonal marker NF-H. In control eyes, tau was enriched in RGC axons

visualized with NF-H (Fig 6A-C, M-O). In contrast, optic nerves in 3xTg eyes from both 3- and 6-month-old mice displayed a striking reduction in axonal tau protein (Fig. 6G-L, S-X). High magnification confocal images of optic nerve fascicles revealed that many NF-H positive axons were still detected even when tau was reduced (Fig. 6J-L, V-X), indicating that a decrease in tau could not be solely ascribed to axonal degeneration. Western blot analysis of optic nerve homogenates confirmed a significant reduction in tau protein, primarily the 37-kDa and 100 kDa forms, in 3xTg retinas (Fig 6Y, Z). Taken together, our results demonstrate that tau is markedly reduced in RGC axons within the optic nerve.

#### **4.4.5. Anterograde axonal transport is impaired prior to neuronal death in AD**

RGCs, like other projecting neurons, rely heavily on axonal transport to adequately function. Anterograde transport impairment is recognized as an early sign of RGC dysfunction (Crish et al., 2010). Therefore, we examined whether the ability of RGCs to transport the anterograde tracer CT $\beta$  to terminals in the superior colliculus, the primary target of RGCs in the rodent brain (Angelucci et al., 1996), was altered in 3xTg eyes. Alexa Fluor 488-conjugated CT $\beta$  was injected intraocularly and its accumulation in the contralateral superior colliculus was quantified using unbiased stereological sampling (Cueva Vargas et al., 2016). A substantial reduction in the CT $\beta$ -labeled volume was found in 3- and 6-month-old 3xTg mice relative to littermate controls (Fig. 7A-D). Quantification of total CT $\beta$  volume in the superior colliculus confirmed a ~55% reduction in 3xTg retinas at 3 days after tracer injection (Fig. 7E). CT $\beta$ -labeled volume quantification at 1 day after tracer injection revealed that CT $\beta$  was virtually non-existent in the superior colliculus of 3xTg animals (Fig. 7E) confirming major deficits in the ability of RGCs to transport cargos to their targets.

To rule out that anterograde transport deficits were caused by the inability of RGCs to uptake CT $\beta$ , we examined CT $\beta$ -injected retinas with Brn3a, a specific marker of RGC nuclei (Nadal-Nicolas et al., 2009). Abundant cytoplasmic CT $\beta$  surrounding Brn3a-positive nuclei was observed at 24 hr after tracer injection in both wild-type and transgenic retinas (Fig 7F-I). Quantification of Brn3a-positive RGCs containing CT $\beta$  revealed a similar number of neurons in both 3xTg and control mice (Fig. 7J), thus confirming effective CT $\beta$  uptake by RGCs. To determine whether anterograde transport deficits were caused by neuronal death, RGC density was quantified in 3- and 6-month old transgenic retinas using the RGC-specific marker Brn3a (Fig. 8). A similar density of RGCs was found between 3xTg and wild-type mice at 3 months of age (Fig. 8A-B, E), establishing the absence of cell death at a time when major transport deficits are already apparent (Fig. 7A, B, E). In 6-month-old transgenic retinas, there was a modest reduction (14%) in the number of RGCs compared to age-matched wild-type controls (Fig. 8C-E). Collectively, these data demonstrate substantial deficits in anterograde axonal transport that precede neuronal death in AD retinas.

## **4.5. DISCUSSION**

In this study, we characterize major pathological alterations in the retina and visual pathways associated with neuronal dysfunction in a murine model of AD. First, we demonstrate that retinal tau accumulation occurs early and precedes both build up in the brain and the appearance of disease-related behavioural deficits. Second, our data indicate that retinal tau undergoes age-related and epitope-specific changes in AD which are independent of conformational modifications. Third, we show that tau accumulates primarily in RGC dendrites, not stemming from increased gene expression, whereas it is nearly depleted from optic nerve

axons. Lastly, our results demonstrate substantial deficits in anterograde axonal transport that precede neuronal death in AD retinas. Collectively, this study reveals important early alterations in retinal tau leading to neuronal dysfunction and suggests a role for pathological tau in visual deficits associated with AD.

Accumulation of pathological tau is a hallmark of AD and other tauopathies (Buee et al., 2000; Lee et al., 2001; Iqbal et al., 2005; Cairns et al., 2007). Our data using the 3xTg mouse model, demonstrate early accumulation of tau in the retina prior to the onset of behavioural impairments. This finding is consistent with previous studies demonstrating increased retinal tau levels in murine models of tauopathies (Gasparini et al., 2011; Schon et al., 2012; Ho et al., 2015; Mazzaro et al., 2016). The increase in retinal tau reported here was considerably more pronounced in younger mice (3 months) than in older individuals (6 months) indicating a robust retinal response early in the pathology of the disease. Retinal tau levels increase with age, which is consistent with tau accumulation in the retinas of elderly individuals shown here and in previous studies (Leger et al., 2011; Chiasseu et al., 2016). Therefore, in younger animals with low basal levels of retinal tau the net difference between AD and control retinas is more pronounced, whereas in older mice the relative change in tau levels is less noticeable. This early imbalance in tau levels in younger individuals might increase the risk of neuronal dysfunction and subsequent neurodegeneration. Importantly, we convincingly demonstrate that the accumulation of tau in the retina precedes tau build up in the hippocampus and prefrontal cortex. Moreover, even when tau accumulation is detected in both retinas and brains of older transgenic mice, the relative increase in tau burden is still higher in the retina than in the brain. These results suggest that the retina is highly sensitive at reflecting early and subtle changes in tau expression during AD.

Phosphorylation is a critical post-translational modification of tau during development and in pathological conditions (Hanger et al., 2009). Indeed, inclusions of phosphorylated tau are found in most tauopathies and correlate with severity of disease (Augustinack et al., 2002; Sergeant et al., 2008). However, virtually nothing is known about alterations in tau phosphorylation in the AD retina. We found that while tau residues S202/T205 were highly phosphorylated, there was a net decrease in phospho-S199 relative to total tau levels in young mice. Intriguingly, this pattern was reversed in older animals, indicative of an age-dependent regulation of retinal tau phosphorylation. Tau conformational changes and misfolding have been associated with early neuronal pathology in AD and other tauopathies (Hyman et al., 1988; Carmel et al., 1996; Jicha et al., 1997). Our studies using the conformation-dependent antibodies ALZ-50 and MC-1 did not reveal any evidence of tau misfolding in transgenic retinas, thus ruling out conformational changes at these epitopes in retinal tau pathology.

Tau is an axonal-enriched protein and abnormal tau localization to compartments other than the axon, including soma and dendrites, strongly correlates with neuronal pathology and cognitive decline (Zempel and Mandelkow, 2014). RGCs are highly polarized neurons: their soma, dendrites and initial non-myelinated axonal segments are located within the retina, whereas their distal myelinated axons are in the optic nerve outside the eye and establish synaptic terminals with targets in the brain (Calkins, 2012; Calkins and Horner, 2012). Our data show a pronounced alteration of tau localization between the intraocular and extraocular RGC compartments. Specifically, in AD retinas, tau accumulated in RGC dendrites and intraretinal axons, while it was depleted from axons in the optic nerve. The abnormal tau distribution documented here is consistent with pathological changes observed in diseases affecting RGCs



such as glaucoma, in which tau accumulates in RGC dendrites leading to neurotoxicity (Chiasseu et al., 2016a).

The lack of changes in tau mRNA levels reported here rules out transcriptional regulation as a mechanism for retinal tau accumulation in AD. The mislocalization of tau in transgenic RGCs points to the existence of alterations in the sorting mechanisms that control the normal distribution of tau in different neuronal compartments. A key process that regulates protein sorting is anterograde axonal transport, which ensures tau distribution over long distances (Utton et al., 2002; Konzack et al., 2007). Our data using the tracer CT $\beta$  demonstrate early and substantial deficits in anterograde transport along RGC axons in 3xTg mice, which is consistent with a previous report in a model of frontotemporal dementia (Bull et al., 2012). A dramatic decrease in the ability of RGC axons to transport CT $\beta$  to the brain was observed at 1 or 3 days following intravitreal delivery of the tracer, suggesting major deficits in transport efficiency and kinetics.

Tau protein is sorted from soma to axons (Scholz and Mandelkow, 2014), thus anterograde transport impairment can potentially explain our finding that tau accumulates in RGC dendrites and intraretinal axons. In this scenario, the translated tau protein would only rely on passive diffusion to travel the shorter distance from the somatodendritic compartment to the initial axonal segment (Konzack et al., 2007; Li et al., 2011). Alternatively, dissociation of tau from microtubules and disruption of the cytoskeletal network might block axonal transport leading to further accumulation of tau in the retina. In support of this idea, tau overexpression in primary cultures of RGCs inhibited axonal transport of mitochondria and other cell components, a response that was rescued by tau phosphorylation by the microtubule affinity regulating kinase (MARK) (Mandelkow et al., 2004). It will be of interest, in future work, to establish whether tau

build up is the cause or the result of axonal transport defects. We cannot rule out that other mechanisms may also account for tau missorting in RGCs including, but not limited to, altered protein turn over and/or reduced axonal tau stability (Li et al., 2011; Zempel and Mandelkow, 2014b). Importantly, axonal transport dysfunction could not be ascribed to cell death because transport deficits were detected in young transgenic mice prior to RGC loss. Therefore, these data provide evidence for early RGC dysfunction in AD that precedes overt neurodegeneration.

#### **4.6. CONCLUSIONS**

Substantial visual deficits have been documented in Alzheimer's disease patients, however, the molecular basis of this impairment is poorly understood. This study reveals early and profound alterations in retinal tau including abnormal phosphorylation, accumulation and missorting. These changes correlate with substantial retinal neuron dysfunction and subsequent death, suggesting a prominent role of pathological tau in visual defects. The eye is the most accessible part of the central nervous system and its transparent media allow swift visualization of the retina. Tau accumulation within retinal structures is a promising target to detect early pathological changes and to monitor disease progression in AD.

#### **4.7. REFERENCES**

- Alonso AdC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2:783-787.
- Angelucci A, Clasca F, Sur M (1996) Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *Journal of neuroscience methods* 65:101-112.

- Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:26-35.
- Aviles-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Garcia-Aviles A, Lafuente MP, Rodriguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2003) Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol* 184:767-777.
- Ballatore C, Lee VMY, Trojanowski JQ (2007a) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:663-672.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007b) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nature reviews Neuroscience* 8:663-672.
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Molecular biology of the cell* 13:4013-4028.
- Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, et al. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *The EMBO journal* 11:1593-1597.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45:675-688.
- Blanks JC, Hinton DR, Sadun AA, Miller CA (1989) Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Research* 501:364-372.
- Blanks JC, Torigoe Y, Hinton DR, Blanks RH (1996a) Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiol Aging* 17:377-384.
- Blanks JC, Schmidt SY, Torigoe Y, Porrello KV, Hinton DR, Blanks RH (1996b) Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL. *Neurobiol Aging* 17:385-395.
- Boyne LJ, Tessler A, Murray M, Fischer I (1995) Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J Comp Neurol* 358:279-293.

- Braak H, Braak E (1995) Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging* 16:271-278.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain research Brain research reviews* 33:95-130.
- Bull ND, Guidi A, Goedert M, Martin KR, Spillantini MG (2012) Reduced axonal transport and increased excitotoxic retinal ganglion cell degeneration in mice transgenic for human mutant P301S tau. *PloS one* 7:e34724.
- Cairns NJ et al. (2007) Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 114:5-22.
- Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J (1996) The Structural Basis of Monoclonal Antibody Alz50's Selectivity for Alzheimer's Disease Pathology. *Journal of Biological Chemistry* 271:32789-32795.
- Carrillo MC, Dean RA, Nicolas F, Miller DS, Berman R, Khachaturian Z, Bain LJ, Schindler R, Knopman D (2013) Revisiting the framework of the National Institute on Aging-Alzheimer's Association diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia* 9:594-601.
- Carroll JC, Rosario ER, Kreimer S, Villamagna A, Gentschein E, Stanczyk FZ, Pike CJ (2010) Sex differences in beta-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res* 1366:233-245.
- Cheung CY-I, Ong YT, Ikram MK, Ong SY, Li X, Hilal S, Catindig J-AS, Venketasubramanian N, Yap P, Seow D, Chen CP, Wong TY (2014) Microvascular network alterations in the retina of patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 10:135-142.
- Chiasseu M, Cueva Vargas JL, Destroismaisons L, Vande Velde C, Leclerc N, Di Polo A (2016) Tau Accumulation, Altered Phosphorylation, and Missorting Promote Neurodegeneration in Glaucoma. *The Journal of Neuroscience* 36:5785-5798.
- Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ (2010) Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:5196-5201.
- Cronin-Golomb A (1995) Vision in Alzheimer's disease. *The Gerontologist* 35:370-376.

- Cronin-Golomb A, Corkin S, Growdon JH (1995) Visual dysfunction predicts cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 72:168-176.
- Cronin-Golomb A, Gilmore GC, Nearing S, Morrison SR, Laudate TM (2007) Enhanced stimulus strength improves visual cognition in aging and Alzheimer's disease. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior* 43:952-966.
- Cueva Vargas JL, Belforte N, Di Polo A (2016) The glial cell modulator ibudilast attenuates neuroinflammation and enhances retinal ganglion cell viability in glaucoma through protein kinase A signaling. *Neurobiology of Disease* 93:156-171.
- Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR (2003) Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Molecular and cellular neurosciences* 22:49-61.
- Delacourte A, Dufosse A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *Journal of the Neurological Sciences* 76:173-186.
- Dong DW, Zhang YS, Yang WY, Wang-Qin RQ, Xu AD, Ruan YW (2014) Hyperphosphorylation of tau protein in the ipsilateral thalamus after focal cortical infarction in rats. *Brain Res* 1543:280-289.
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110<sup>mark</sup>): A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *Journal of Biological Chemistry* 270:7679-7688.
- Feany MB, Mattiace LA, Dickson DW (1996) Neuropathologic Overlap of Progressive Supranuclear Palsy, Pick's Disease and Corticobasal Degeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55:53-67.
- Gasparini L, Anthony Crowther R, Martin KR, Berg N, Coleman M, Goedert M, Spillantini MG (2011) Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: Effects on axonal viability. *Neurobiology of Aging* 32:419-433.
- Gendreau KL, Hall GF (2013) Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol* 4:160.

- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1983-1987.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI (1992) Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *Journal of Biological Chemistry* 267:564-569.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.
- Gupta VK, Chitranshi N, Gupta VB, Golzan M, Dheer Y, Wall RV, Georgevsky D, King AE, Vickers JC, Chung R, Graham S (2016) Amyloid  $\beta$  accumulation and inner retinal degenerative changes in Alzheimer's disease transgenic mouse. *Neuroscience Letters* 623:52-56.
- Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA (1986) Optic-Nerve Degeneration in Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 315:485-487.
- Ho WL, Leung Y, Cheng SSY, Lok CKM, Ho Y-S, Baum L, Yang X, Chiu K, Chang RC-C (2015) Investigating degeneration of the retina in young and aged tau P301L mice. *Life Sciences* 124:16-23.
- Hyman BT, Kromer LJ, Van Hoesen GW (1988) A direct demonstration of the perforant pathway terminal zone in Alzheimer's disease using the monoclonal antibody Alz-50. *Brain Res* 450:392-397.
- Iqbal K, del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong C-X, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1739:198-210.
- Jackson GR, Owsley C (2003) Visual dysfunction, neurodegenerative diseases, and aging. *Neurol Clin* 21:709-728.
- Javaid FZ, Brenton J, Guo L, Cordeiro MF (2016) Visual and Ocular Manifestations of Alzheimer's Disease and Their Use as Biomarkers for Diagnosis and Progression. *Front Neurol* 7:55.

- Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P (1997) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 48:128-132.
- Katz B, Rimmer S (1989) Ophthalmoplegic migraine with superior ramus oculomotor paresis. *J Clin Neuroophthalmol* 9:181-183.
- Kesler A, Vakhapova V, Korczyn AD, Naftaliev E, Neudorfer M (2011) Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clinical neurology and neurosurgery* 113:523-526.
- Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, Yasuolham, Miyamoto E, Miyakawa T (1996) Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 7:177-181.
- Konzack S, Thies E, Marx A, Mandelkow EM, Mandelkow E (2007) Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9916-9927.
- Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ, Schellenberg GD (2003) Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9980-9985.
- Kuret J, Chirita CN, Congdon EE, Kannanayakal T, Li G, Necula M, Yin H, Zhong Q (2005) Pathways of tau fibrillization. *Biochim Biophys Acta* 1739:167-178.
- Kwong JM, Caprioli J, Piri N (2010) RNA binding protein with multiple splicing: a new marker for retinal ganglion cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 51:1052-1058.
- Lebrun-Julien F, Bertrand MJ, De Backer O, Stellwagen D, Morales CR, Di Polo A, Barker PA (2010) ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3817-3822.
- Lee AG, Martin CO (2004) Neuro-ophthalmic findings in the visual variant of Alzheimer's disease. *Ophthalmology* 111:376-380; discussion 380-371.
- Lee VMY, Goedert M, Trojanowski JQ (2001) Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24:1121-1159.
- Leger F, Fernagut P, Cannon M, Léoni S, Vital C, Tison F, Bezard E, Vital A (2011) Protein aggregation in the aging retina. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:63-68.

- Liu B, Rasool S, Yang Z, Glabe CG, Schreiber SS, Ge J, Tan Z (2009) Amyloid-peptide vaccinations reduce beta-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *The American journal of pathology* 175:2099-2110.
- Mailliot C, Sergeant N, Bussi re T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Bu e L (1998) Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Letters* 433:201-204.
- Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol* 167:99-110.
- Masland RH (2012) The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76:266-280.
- Mazzaro N, Barini E, Spillantini MG, Goedert M, Medini P, Gasparini L (2016) Tau-Driven Neuronal and Neurotrophic Dysfunction in a Mouse Model of Early Tauopathy. *The Journal of Neuroscience* 36:2086-2100.
- Mendola JD, Cronin-Golomb A, Corkin S, Growdon JH (1995) Prevalence of visual deficits in Alzheimer's disease. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 72:155-167.
- Migheli A, Butler M, Brown K, Shelanski M (1988) Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J Neurosci* 8:1846-1851.
- Morquette B, Morquette P, Agostinone J, Feinstein E, McKinney RA, Kolta A, Di Polo A (2015) REDD2-mediated inhibition of mTOR promotes dendrite retraction induced by axonal injury. *Cell Death Differ* 22:612-625.
- Morsch R, Simon W, Coleman PD (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58:188-197.
- Mouton PR (2002) Principles and practices of unbiased stereology : an introduction for bioscientists.: The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.
- Nadal-Nicolas FM, Jimenez-Lopez M, Sobrado-Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas-Navarro M, Vidal-Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Investigative ophthalmology & visual science* 50:3860-3868.



- Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J (2008) Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:5136-5143.
- Oblinger MM, Argasinski A, Wong J, Kosik KS (1991) Tau gene expression in rat sensory neurons during development and regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:2453-2459.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:1063-1070.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b) Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39:409-421.
- Otvos L, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VMY (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *Journal of Neuroscience Research* 39:669-673.
- Paquet C, Boissonnot M, Roger F, Dighiero P, Gil R, Hugon J (2007) Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 420:97-99.
- Parisi V, Restuccia R, Fattapposta F, Mina C, Bucci MG, Pierelli F (2001) Morphological and functional retinal impairment in Alzheimer's disease patients. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 112:1860-1867.
- Plouffe V, Mohamed NV, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M, Leclerc N (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PloS one* 7:e36873.
- Porzig R, Singer D, Hoffmann R (2007) Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358:644-649.
- Rizzo M, Anderson SW, Dawson J, Nawrot M (2000) Vision and cognition in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 38:1157-1169.

- Rodriguez AR, de Sevilla Muller LP, Brecha NC (2014) The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 522:1411-1443.
- Scholz T, Mandelkow E (2014) Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci* 71:3139-3150.
- Schon C, Hoffmann NA, Ochs SM, Burgold S, Filser S, Steinbach S, Seeliger MW, Arzberger T, Goedert M, Kretschmar HA, Schmidt B, Herms J (2012) Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PloS one* 7:e53547.
- Schön C, Hoffmann NA, Ochs SM, Burgold S, Filser S, Steinbach S, Seeliger MW, Arzberger T, Goedert M, Kretschmar HA, Schmidt B, Herms J (2012) Long-term in vivo imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS ONE* 7:e53547.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E-M (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of Cell Biology* 156:1051-1063.
- Stover KR, Campbell MA, Van Winssen CM, Brown RE (2015) Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 289:29-38.
- Uhlmann RF, Larson EB, Koepsell TD, Rees TS, Duckert LG (1991) Visual impairment and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of general internal medicine* 6:126-132.
- Utton MA, Connell J, Asuni AA, van Slegtenhorst M, Hutton M, de Silva R, Lees AJ, Miller CCJ, Anderton BH (2002) The Slow Axonal Transport of the Microtubule-Associated Protein Tau and the Transport Rates of Different Isoforms and Mutants in Cultured Neurons. *The Journal of Neuroscience* 22:6394-6400.
- Williams MA, McGowan AJ, Cardwell CR, Cheung CY, Craig D, Passmore P, Silvestri G, Maxwell AP, McKay GJ (2015) Retinal microvascular network attenuation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 1:229-235.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-Derived Factors Stimulate Optic Nerve Regeneration. *The Journal of Neuroscience* 23:2284-2293.

Zempel H, Mandelkow E (2014) Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci* 37:721-732.

## 4.8. FIGURES

### **FIGURE 1. Tau protein build up in the retina precedes accumulation in the brain.**

(A) Western blots of mice retina homogenates probed with an antibody against total tau (K9JA) revealed the presence of four tau isoforms of 37-kDa, 50-kDa, 55-kDa and 100-kDa, which all increased in the 3-month-old 3xTg mice relative to wild-type (WT) littermate controls. All the isoforms were absent in tau knockout mice. (B) Western blot analysis of brain homogenates from 3-month-old mice revealed four isoforms of 37-kDa, 50-kDa, 55-kDa and 65-kDa, which level remained the same between 3xTg and control mice. Tau was absent from tau knockout brain samples. (C) Densitometric analysis showed a 1.8, 1.6, 1.9 and 1.9-fold increase in the 37-kDa, 50-kDa, 55-kDa, and 100-kDa tau variants, respectively, in 3xTg subjects (N=10) compared to WT controls (N=8) (Student's *t* test, \*:  $p < 0.05$ ). (D) Quantification revealed no changes in tau levels in the brain between WT (N=8) and 3xTg (N=10). (E) Western blot analysis of tau changes at 6 months demonstrated that only the 55-kDa tau form increased in the 3xTg subject with respect to WT. (F) Probing of tau changes in the brain at 6 months confirmed increase in 55-kDa tau in the transgenic brain with respect to littermate controls G) Densitometry analysis indicated a 1.4-fold increase in 55-kDa isoform in the retina of the 3xTg mice when compared to WT controls (3xTg: N=5, WT: N=4, Student's *t* test, \*= $p < 0.05$ ). (H) Analysis of tau changes in the brain revealed that tau levels were 1.3-fold higher in transgenic mice relative to controls (3xTg: N=5, WT: N=4, Student's *t* test, \*= $p < 0.05$ ). n.s.: Not significant. Vertical lines represent non-consecutive samples from the same gel.

**FIGURE 2. Retinal tau undergoes epitope-specific and age-dependent phosphorylation changes in AD.**

(A-C) Western blot analyses of retinal homogenates from 3-month-old mice probed with the phospho-tau specific antibodies PHF1, PS199 and AT8 revealed changes in tau phosphorylation between 3xTg and wild-type (WT) littermate control mice. (D-F) Densitometry analysis of phospho-tau relative to total tau revealed increased tau phosphorylation on S202/T205 (AT8) and reduced phospho-tau on S199 (PS199) in 3xTg retina relative to controls. No phosphorylation changes were observed on S396/S404 (PHF1), (3xTg: N=5, WT: N=4, Student's t test,  $*=p < 0.05$ ,  $**=p < 0.01$ ). (G-I) Western blot analysis of tau phosphorylation in 6-month-old retinas showed alterations on epitopes PHF1, PS199 and AT8. (J-L) Quantitative analysis of tau phosphorylation in the 3xTg retina demonstrated decreased tau phosphorylation on S202/T205 residues and increased phosphorylation on S199 relative to controls (3xTg: N=5, WT: N=4, Student's t test,  $*=p < 0.05$ ,  $**=p < 0.01$ ,  $***=p < 0.001$ ). Phosphorylation on S396/S404 residues remained unchanged. n.s.: Not significant. Vertical lines represent non-consecutive samples from the same gel.

**FIGURE 3. Lack of conformational tau changes in AD retinas.**

(A, B) Western blot analysis of retinal extract from 3-month-old 3xTg mice probed using the conformation-dependent MC-1 and ALZ-50 demonstrated no changes in tau conformation between transgenic and control mice. (C, D) Densitometry confirmed the lack of variations in tau conformation between both groups (3xTg: N=5, WT: N=4). (E, F) Western blot analysis of retinal homogenates from 6-month-old mice revealed the absence of changes in tau conformation between transgenic and control mice. (G, H) Statistical analysis demonstrated the absence of tau

misfolding in 3xTg retinas (3xTg: N=5, WT: N=4). n.s.: Not significant. Vertical lines represent non-consecutive samples from the same gel.

**FIGURE 4. Tau accumulates in the somatodendritic compartment of RGCs.**

(A, B) Immunostaining of retinal sections from 3-month-old animals with K9JA, which labels total tau, showed marked tau accumulation in 3xTg retinas relative to wild-type (WT) littermate controls. (C-E) Co-staining of tau with TUJ1, a RGC-specific marker, demonstrated tau accumulation in RGC dendrites. (F-Q) Whole-mount retinal preparations from 3- and 6-month-old mice show co-localization of tau and RBPMS, a selective marker of RGC soma, demonstrated age-dependent accumulation of tau in RGC somata. Scale bars: A–B= 50  $\mu$ m, D–F= 25  $\mu$ m, G–R= 50  $\mu$ m. ONL: outer nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, INL: inner nuclear layer, IPL: inner plexiform layer, GCL: ganglion cell layer.

**FIGURE 5. Tau accumulates in RGC intraretinal axons.**

(A-F) Labelling of whole-mounted retinas with tau and the axonal marker NF-H revealed marked accumulation of tau in intraretinal axons of young (3 months) transgenic mice relative to controls. (G-L) Tau build up in intraretinal axons, visualized with NF-H, was more pronounced in intraretinal axons of 6-month-old transgenic mice. (M) Real-time PCR analysis showed no changes in retinal tau gene expression at 3 months (3xTg: N=3, WT: N=3). n.s.: Not significant. Scale bars: A–L= 50  $\mu$ m.

**FIGURE 6. Tau is depleted from RGC axons in transgenic optic nerves**

(A-F) Optic nerve cross sections co-labelled with tau and NF-H depict high levels of tau in RGC axons from wild-type control mice. (G-L) In contrast, optic nerve from age-matched 3xTg animals displayed a marked reduction in tau levels, which was not due to axonal loss as co-staining with NF-H confirmed an abundance of RGC axons. (M-X) Tau expression in 3xTg optic nerve axons was much reduced in older mice (6 months) as demonstrated by the marked loss of tau labelling in the optic nerve despite the persistence of NF-H staining. Scale bars: A-C, G-I, M-O, S-U= 10  $\mu$ m; D-F, J-L, P-R, V-X= 4  $\mu$ m. (Y, Z) Western blot analysis of tau expression in optic nerve samples confirmed the reduction of tau in 3xTg mice (3 months) relative to controls (3xTg: N=6, WT: N=9, Student's *t* test,  $*=p < 0.05$ ). n.s.: Not significant. Vertical lines represent non-consecutive samples from the same gel.

**FIGURE 7. Anterograde transport along RGC axons is impaired in 3xTg mice.**

(A-D) Unbiased stereological rostral to caudal sampling of the superior colliculus at 3 days after CT $\beta$  injection showed marked reduction of CT $\beta$ -labelled areas in both 3- and 6-month-old 3xTg mice relative to controls. (E) Volume analysis of the total CT $\beta$  positive region in the superior colliculus at 3 days after tracer administration, demonstrated a striking loss of anterograde transport in transgenic mice compared to controls (3-month-old 3xTg: N=5, 3-month-old WT: N=3, 6-month-old 3xTg: N=5, 6-month-old WT: N=5) (Student's *t* test,  $*=p < 0.05$ ). Loss of anterograde transport was more apparent when analysis was carried out at 1 day after tracer administration (3-month-old 3xTg: N=3, 3-month-old WT: N=3) (Student's *t* test,  $*=p < 0.05$ ). (F-I) Staining of CT $\beta$ -injected retina with Brn3a, a selective marker of RGC nuclei, shows cytoplasmic CT $\beta$  (green) surrounding cell nuclei thus confirming that effective CT $\beta$

uptake by RGC in both 3xTg and WT retinas. (J) No significant difference was found in the number of CT $\beta$ -positive RGCs between 3xTg and WT retina at 3 or 6 months of age (3xTg: N=6, WT: N=3) n.s.: Not significant. Scale bars: F-I= 25  $\mu$ m.

**FIGURE 8. Modest RGC loss is detected in the aging AD retinas.**

(A, B) RBPMS staining of whole-mounted retinas showed that at 3 months of age, the density of RGC somata was similar between 3xTg and control mice. (C, D) In 6-month-old 3xTg mice, a modest reduction in RGC density was observed relative to age-matched controls. (E) Quantitative analysis confirmed that RGC soma density remained unchanged in 3-month-old transgenic mice relative to controls (3-month-old 3xTg: N=5, 3-month-old WT: N=6), whereas a mild RGC loss was observed in older mice (6-month-old 3xTg: N=5, 6-month-old WT: N=5) (Student's *t* test, \* $p < 0.05$ ). n.s: Not significant. Scale bars: A-D= 7.5  $\mu$ m.



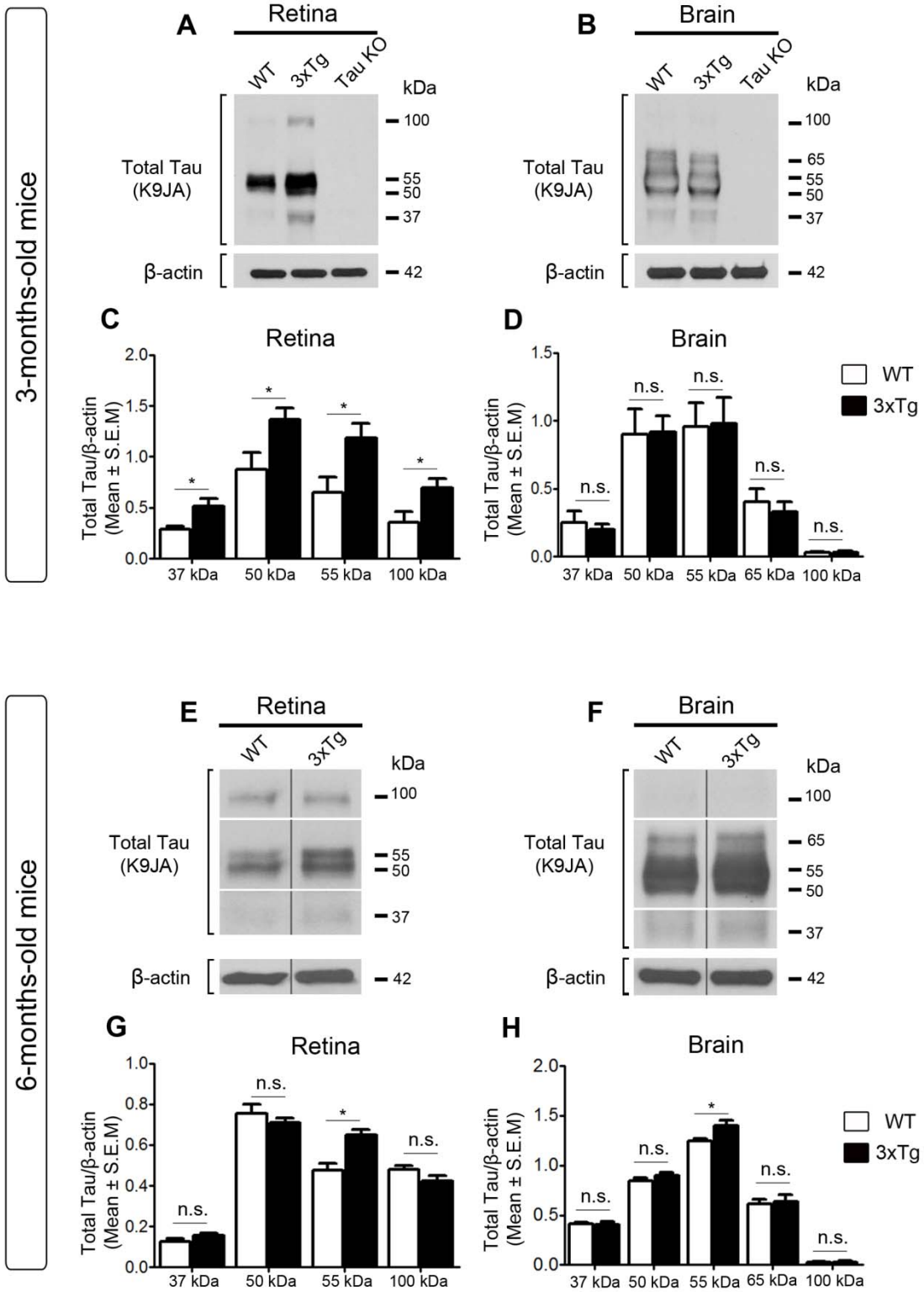


Figure 1

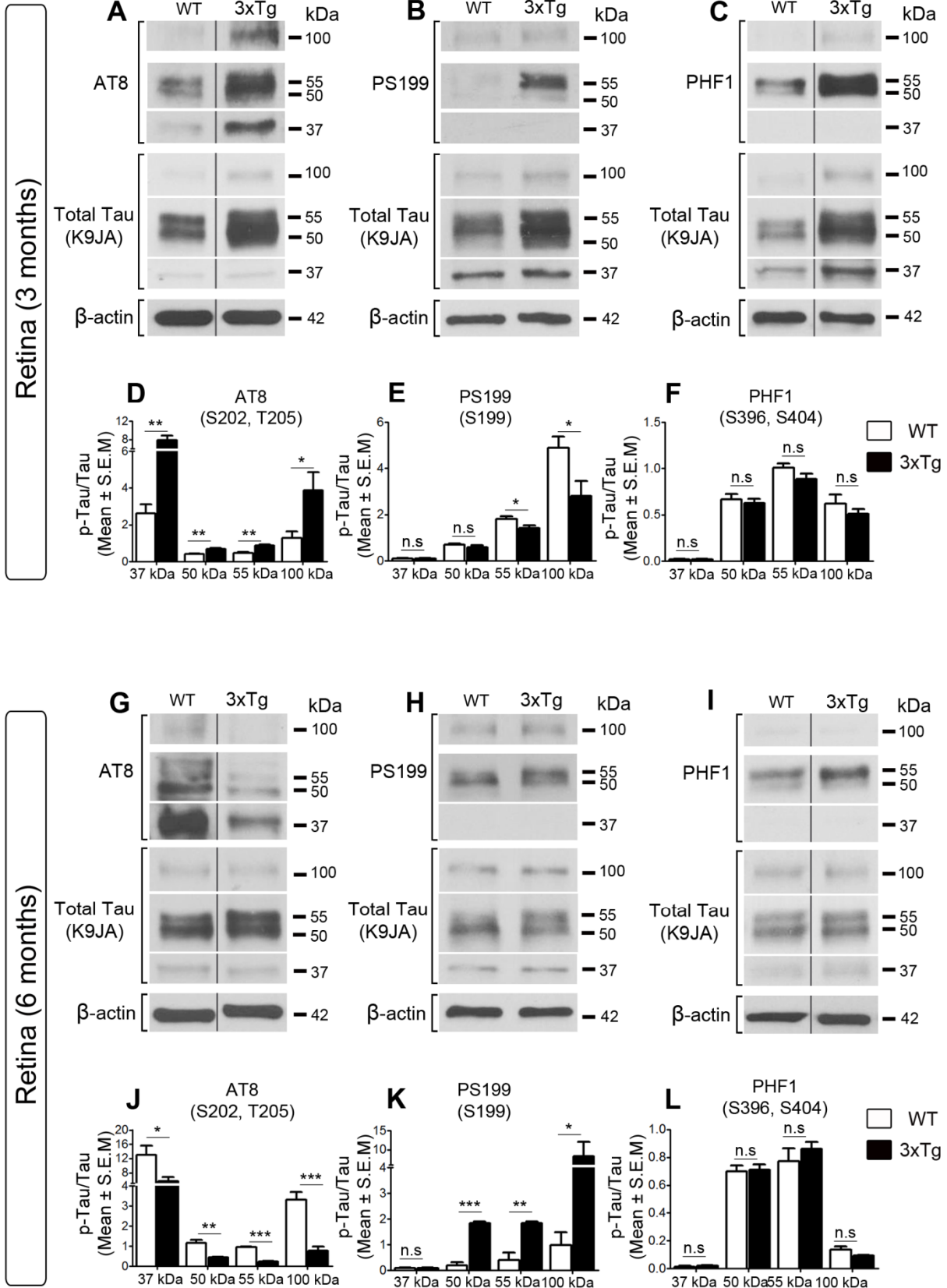


Figure 2

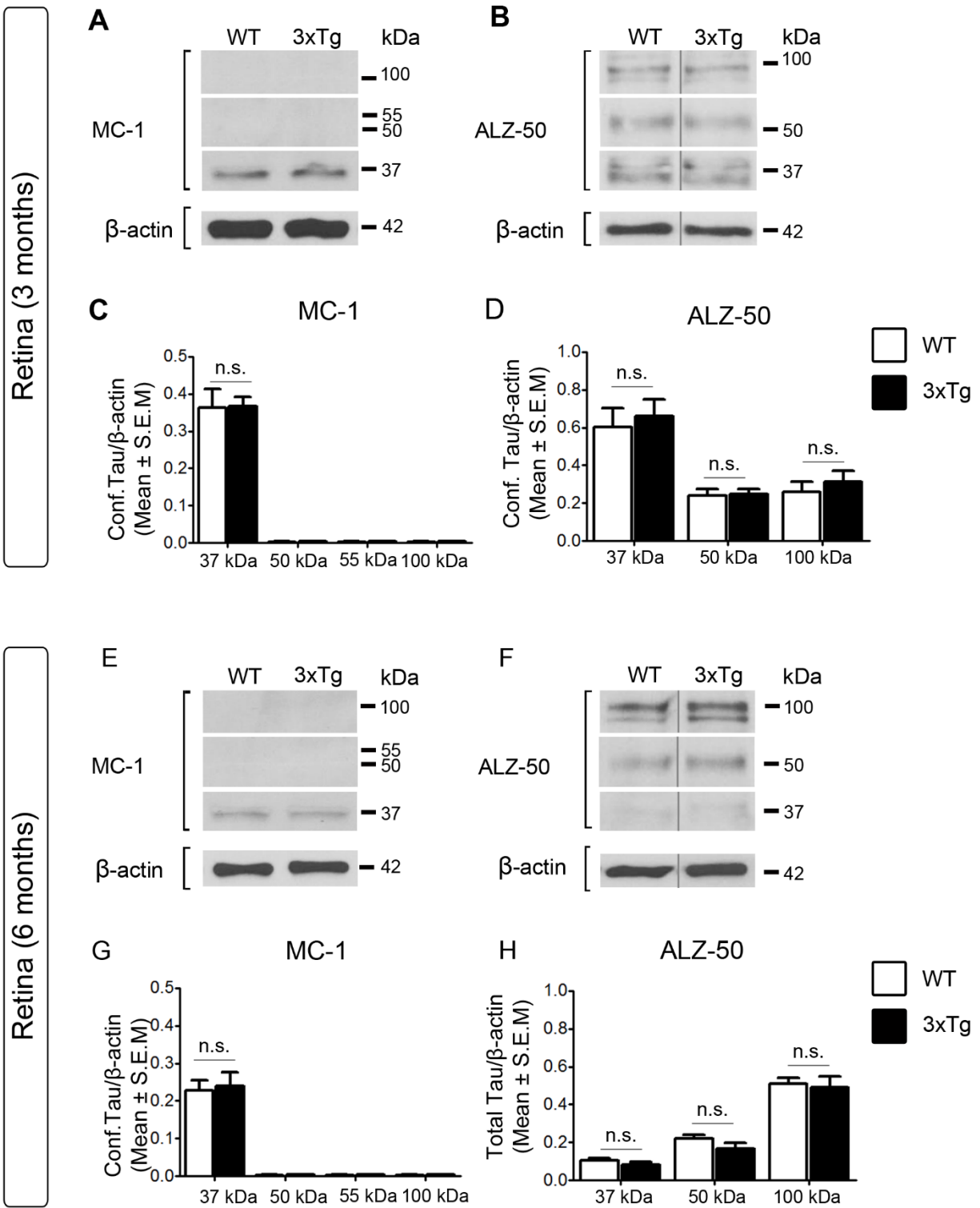


Figure 3

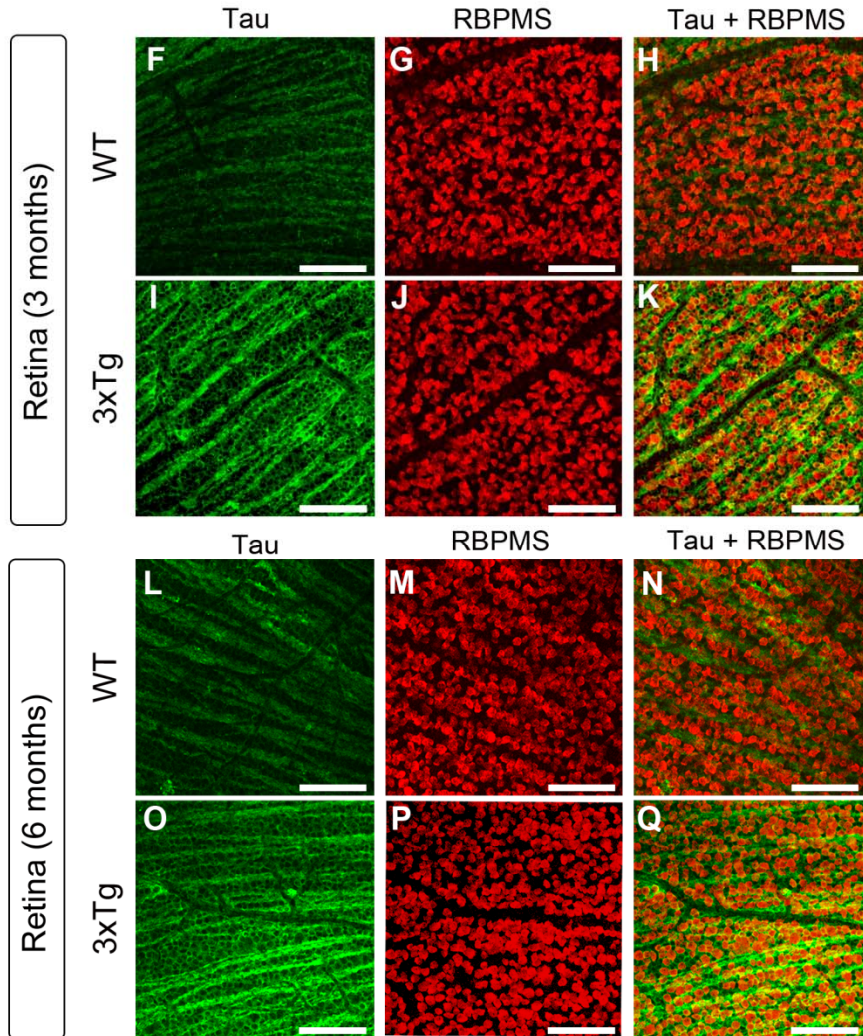
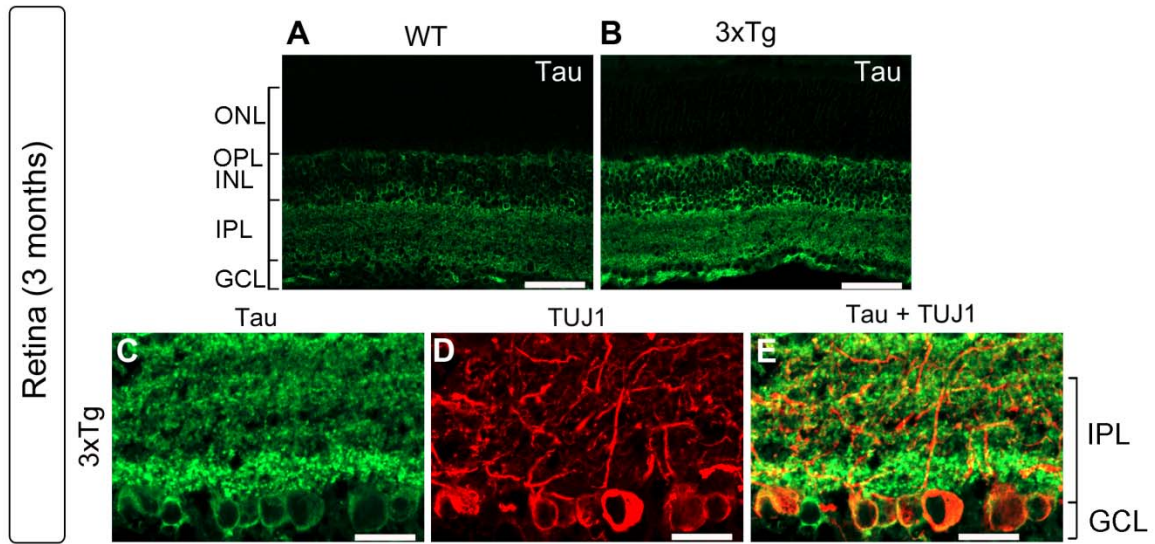


Figure 4



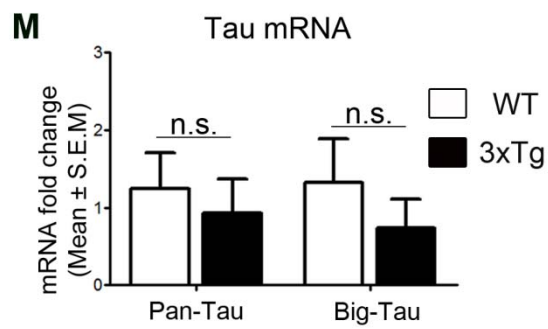
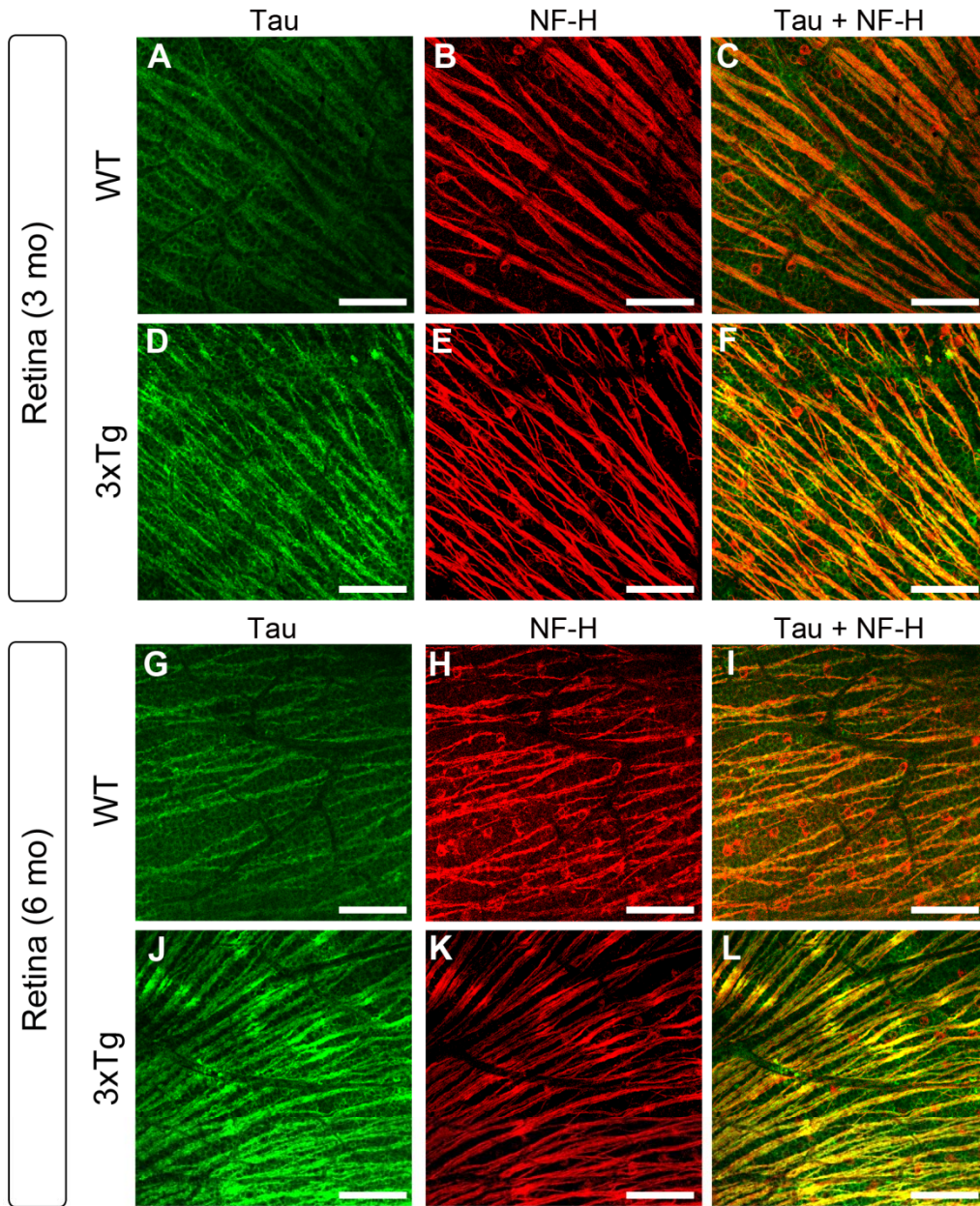


Figure 5

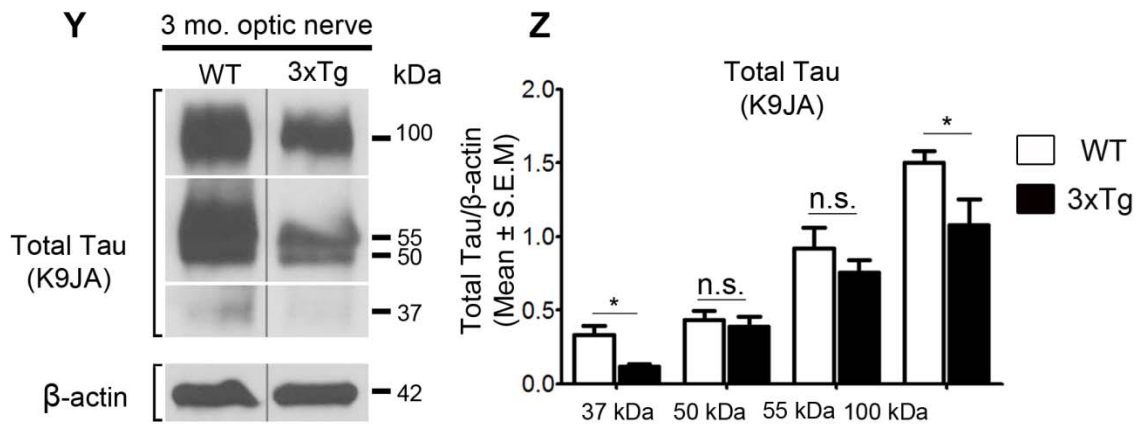
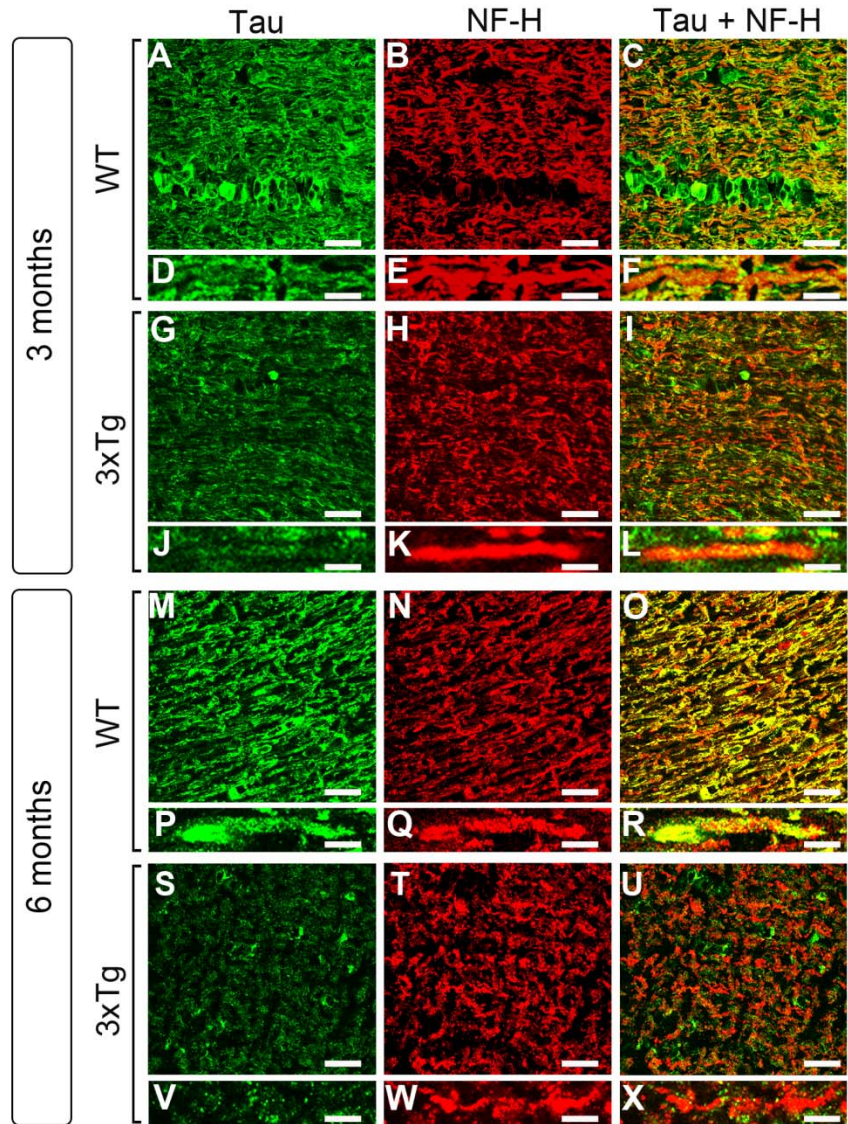


Figure 6

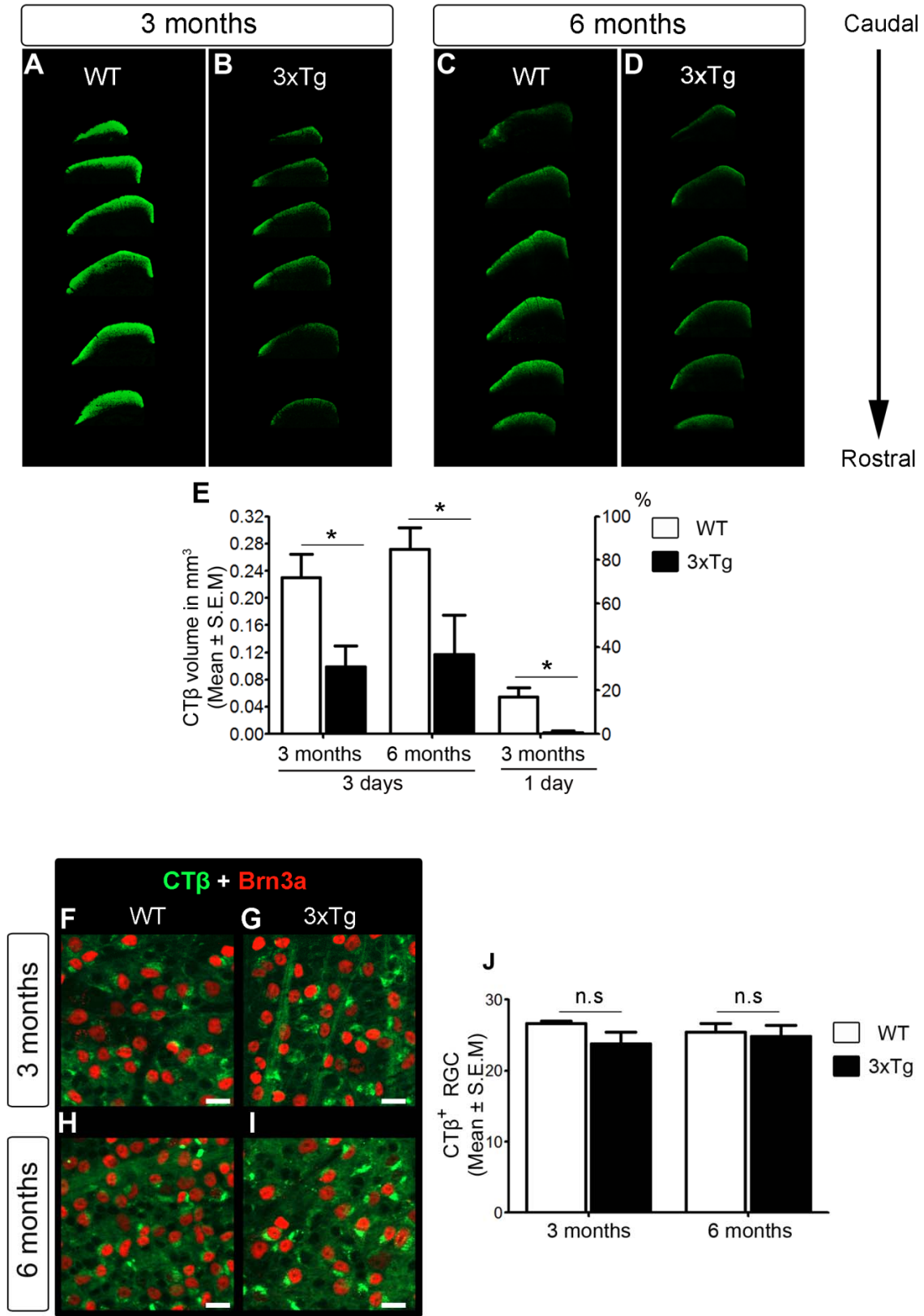


Figure 7



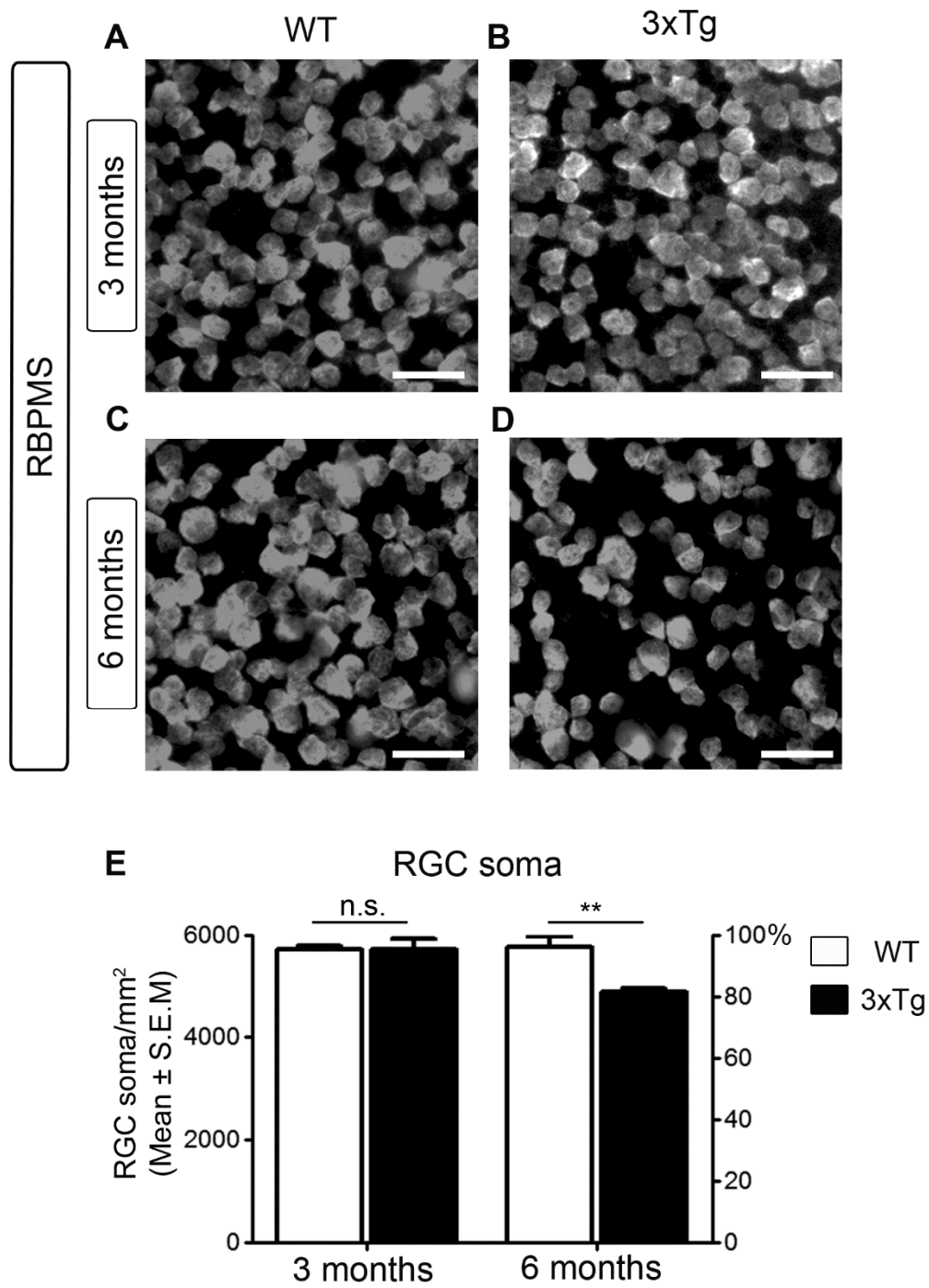


Figure 8



Chapitre V.

**Discussion générale**

## **5.1 Contribution de la protéine tau à la perte des CGR**

Les résultats présentés dans cette thèse démontrent que l'altération de la protéine tau dans la rétine résulte en la mort des CGR. Pour parvenir à cette conclusion, nous avons utilisé deux modèles de pathologie neurodégénérative, à savoir le glaucome et MA dans lesquels nous avons analysé par western blot et par immunohistochimie l'expression de tau dans la rétine ainsi que ses effets sur la survie des CGR.

C'est ainsi que dans le chapitre III, nous montrons chez le rat adulte que 3 semaines après induction de l'HTO, principal facteur de risque du glaucome, il se produit une hausse prononcée de l'expression de tau dans la rétine. De manière importante nous prouvons que cette accumulation de tau est neurotoxique puisque la réduction de sa production par le biais d'ARN d'interférence dirigés contre tau augmente la survie des CGR. Les données présentées dans le chapitre IV révèlent que la rétine de sujets 3xTg, qui expriment entre autres la mutation tau P301L, manifeste une accumulation précoce et marquée de tau, détectable dès le 3<sup>ème</sup> mois. Dans les CGR, la hausse de tau est associée à une perte de fonction drastique, qui se solde par une mort neuronale liée au vieillissement. Ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique qui stipule que l'accumulation de tau dans les neurones cause une neurodégénérescence (Buée et al., 2010; Gendreau and Hall, 2013; De Strooper and Karran, 2016).

## **5.2 Altérations du profil de phosphorylation de tau dans la rétine glaucomateuse et alzheimerienne**

Parmi les différentes modifications post-traductionnelles de tau, la phosphorylation est la plus importante sur le plan pathologique. Ceci est d'autant plus vrai que la protéine dispose de

plus de 80 sites putatifs de phosphorylation qui peuvent être changés indépendamment les uns des autres (Buee et al., 2000). Il est usuellement estimé que l'hyperphosphorylation sur plusieurs de ces sites en favorisant la séparation de tau des microtubules promeut son l'accumulation dans le cytoplasme avec comme conséquence ultime la formation d'agrégats (Ballatore et al., 2007). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la phosphorylation de tau sur les résidus Ser396, Ser404 (épitopes de l'anticorps PHF1), Ser199 (épitope de l'anticorps PS199) et Ser202, Thr205 (épitopes de l'anticorps AT8). Ces sites présentent l'intéressante particularité d'être positivement corrélées à la sévérité de la MA (Augustinack et al., 2002).

Nos investigations biochimiques sur les rétines glaucomateuses et alzheimeriennes, montrent que bien que la phosphorylation de tau sur certains résidus puisse de visu paraître important, les analyses quantitatives révèlent un schéma autrement plus complexe. En effet nous avons constaté que le degré de phosphorylation de tau sur un site donné ne correspond pas nécessairement aux variations de phospho-tau illustrées par western blot. Cette discordance est due au fait que le niveau de la protéine totale qui est utilisé comme référent pour la quantification, augmente dans les conditions pathologiques altérant ainsi le ratio final phospho-tau/tau totale. C'est ainsi que nos analyses densitométriques révèlent que dans la rétine glaucomateuse la protéine tau est hyperphosphorylée sur les résidus Ser396 et Ser404, mais hypophosphorylée sur les résidus Ser199. De même dans la rétine de sujets alzheimeriens, la phosphorylation de tau varie selon l'âge avec une hyperphosphorylation de tau sur les résidus Ser202 et Thr205, combiné à une hypophosphorylation sur le résidu Ser199 à 3 mois. Le profil inverse est observé chez les souris âgées de 6 mois.

Ces résultats illustrent bien la complexité du profil de phosphorylation de tau en fonction de la pathologie, de l'âge et des épitopes concernés. En d'autres termes lorsqu'il est question de

la phosphorylation de tau il serait réducteur, et même simpliste, de considérer l'hyperphosphorylation comme étant la seule altération pertinente d'un point de vue pathologique. Bien au contraire, il transparaît de nos études que l'hypophosphorylation fait aussi partie des altérations pathologiques de tau. En accord avec nos observations, le groupe de Wang démontre *in vivo* que l'hyperphosphorylation de tau par GSK-3 $\beta$  bloque l'apoptose en stabilisant la  $\beta$ -caténine qui peut être désormais transloquée dans le noyau pour y induire l'expression de gènes de survie (Li et al., 2007). Pareillement, le même groupe prouve que la déphosphorylation de tau par PP2Ac exerce un effet facilitateur sur l'apoptose en empêchant l'activation de Bcl-2 (Liu et al., 2010). De ces études, on en déduit que contrairement à l'idée communément admise, l'hypophosphorylation de tau serait également capable de provoquer la mort des neurones par apoptose. Conformément à cette notion, il est montré que l'introduction de la mutation P301L dans l'exon 10 du gène murin de tau (modèle P301L knock-in) provoque une hypophosphorylation de tau dans les neurones corticaux. À cela s'ajoute une baisse de l'affinité de tau pour les microtubules le tout culminant en des troubles de la locomotion (Gilley et al., 2012; Rodríguez-Martín et al., 2016). De ces études, il émerge que l'hypophosphorylation relative de tau est capable tout autant que l'hyperphosphorylation de produire des effets délétères sur les CGR glaucomateuses et alzheimeriennes.

Comment expliquer l'altération de la phosphorylation de tau dans la rétine malade ? Dans le cas de notre modèle de démence, la présence de la mutation P301L dans l'exon 10 diminue l'affinité de la protéine pour les microtubules. Ces changements augmentent la quantité de tau libre dans le cytosol où il devient un substrat plus disponibles pour les kinases et les phosphatases, ce qui promeut l'apparition d'anomalies dans le profil de phosphorylation de la protéine. Par contre dans le glaucome, en absence de mutation de la protéine tau endogène, il est

probable que les changements de phosphorylations résultent directement d'anomalies dans l'activité des kinases incluant GSK3 $\beta$ , CDK5, MAPK, et des phosphatases de tau tel que PP2A et PP2B/calcineurine. Il a justement été montré *in vivo* que l'inhibition de la GSK3 $\beta$  par le lithium promeut la survie des CGR dans des modèles d'HTO révélant ainsi l'implication de cette kinase dans le glaucome (Wu et al., 2013a). De même, la hausse de l'activité de CDK5 contribue à l'apoptose des CGR dans un modèle d'hypertension oculaire (Chen et al., 2011). On peut donc mettre en hypothèse que l'hyperphosphorylation de tau que nous avons observée dans la rétine oculohypertensive proviendrait de la hausse de l'activité de ces kinases. D'un autre côté, il a été rapporté que la hausse de la pression intraoculaire chez des rats déclenche l'activation de la calcineurine dans la rétine, laquelle participe à la dégénérescence des CGR (Huang et al., 2005b; Qu et al., 2012). Il serait donc possible que la baisse de la phosphorylation de tau sur Ser199 observée dans la rétine glaucomateuse résulte de la déphosphorylation de tau par la calcineurine.

### **5.3 Mécanismes d'accumulation de tau dans la rétine malade**

Qu'est-ce qui pourrait causer l'accumulation de tau dans les rétines glaucomateuse et alzheimerienne ? Une explication plausible serait la hausse de l'expression génique de la protéine. Pour vérifier si tel est le cas nous avons quantifié le niveau d'ARNm de tau dans la rétine de chacune de ces pathologies par PCR quantitative, et ce faisant nous n'avons trouvé aucune différence entre les sujets malades et leurs contrôles sains. Ceci nous a donc permis d'exclure la hausse de la transcription du gène de tau comme cause de l'accumulation de la protéine.

Nous nous sommes ensuite appesantis sur l'étude de la distribution cellulaire de tau par immunohistochimie. Que ce soit dans le glaucome ou dans la MA, nous avons constaté qu'il y a

une hausse du niveau de tau dans les différentes couches de la rétine. Cependant les hausses les plus prononcées avaient lieu dans la couche plexiforme interne et dans la couche des cellules ganglionnaires, zones correspondant respectivement aux dendrites et au soma des CGR. Ces observations sont en accord avec les études antérieures faisant état de l'accumulation de tau dans les couches rétinienne de patients et de modèles animaux (Gupta et al., 2008; Gasparini et al., 2011; Bull et al., 2012; Dapper et al., 2013).

Cependant contrairement aux études précédentes, nos travaux fournissent une analyse plus détaillée de la distribution de tau dans tous les compartiments des CGR. Ainsi nous prouvons que dans les conditions normales tau est fortement exprimé dans la partie myélinisée de l'axone de la cellule ganglionnaire incluse dans le nerf optique. À l'inverse son expression est faible dans le compartiment somatodendritique et le segment intrarétinien (non myélinisé) de l'axone du neurone tous deux enfouis dans la rétine. Mais dans les conditions pathologiques, le niveau de tau augmente considérablement dans le pôle somatodendritique et la partie intraoculaire des axones ceci au détriment du segment axonal extrarétinien. Au total, il se dégage de nos observations que l'accumulation de tau dans la rétine malade, soit dans le cas du glaucome et de la MA, résulte d'une altération de sa distribution entre les différents compartiments de la cellule ganglionnaire. Cette dérégulation de la répartition de tau est en accord avec la littérature sur les tauopathies qui fait état d'une redistribution de tau du compartiment axonal vers le compartiment somatodendritique (Ballatore et al., 2007; Zempel and Mandelkow, 2014).

Il est admis que l'accumulation de tau dans le compartiment somatodendritique et l'altération de son profil de phosphorylation favorise la formation d'oligomères solubles de la protéine, une étape importante dans le processus d'agrégation (Patterson et al., 2011; Lasagna-

Reeves et al., 2012). Nos données montrent justement que dans la rétine glaucomateuse il se produit une formation de dimères et de pentamères solubles de tau. Or ces espèces oligomériques de tau sont très importantes sur le plan pathologique, car il a été prouvé qu'elles sont neurotoxiques (Lasagna-Reeves et al., 2011; Lasagna-Reeves et al., 2012; FÁ et al., 2016). Il est donc possible que la redistribution de tau vers le compartiment intrarétinien des cellules ganglionnaires cause la perte des CGR en stimulant la formation d'oligomères toxiques de tau. Bien que nous n'ayons pas étudié la présence d'oligomères de tau dans la rétine 3xTg, il n'est pas exclu que son accumulation dans la partie intraoculaire de la cellule ganglionnaire conduise également à la formation d'oligomères de tau.

Par contre comparativement aux contrôles, nous n'avons pas obtenu d'évidences de changements de conformation de tau chez les sujets 3xTg âgés de 3 et 6 mois. Ceci suggère que dans nos conditions expérimentales, l'altération du repliement de tau ne contribue pas à l'accumulation de tau dans la rétine. Contrairement à l'altération de la phosphorylation et de la distribution, le changement de la conformation ne semble pas constituer une des modifications précoces de tau dans la rétine alzheimerienne. Ces données sont en accord avec les analyses de cerveaux de patients et de modèles animaux qui montrent que les changements de conformation de tau surviennent après les changements de phosphorylation, y compris sur Ser396 (Mondragón-Rodríguez et al., 2008). Bien que nous n'ayons pas étudié les changements de conformation de tau dans la rétine glaucomateuse, il est probable que 3 semaines post-induction de l'HTO soit relativement tôt dans le processus pathologique pour qu'apparaissent des changements de conformation de la protéine. En revanche, il est toujours possible que des anomalies de conformation de tau puissent être détectées chez des sujets oculohypertensifs et 3xTg ayant atteint un stade avancé de la pathologie.

Comme on pouvait s'y attendre la hausse de la protéine tau rétinienne dans la rétine glaucomateuse est corrélée à la phosphorylation sur Ser396, Ser404. En revanche nous avons été surpris de constater que dans le même modèle, le niveau de tau est négativement corrélé à la phosphorylation sur Ser199. Autrement dit, l'hyperphosphorylation de Ser396, Ser404 agirait de concert avec l'hypophosphorylation de Ser199 pour promouvoir l'accumulation de tau. Ceci suggère donc que contrairement à ce qui est communément admis, l'accumulation – et ultimement l'oligomérisation – de tau met à contribution aussi bien l'hypophosphorylation que l'hyperphosphorylation de la protéine sur différents résidus.

Précisons néanmoins que ces déductions découlent d'analyses corrélatives, et nécessitent d'être confirmées expérimentalement. Une façon de vérifier ces analyses dans le futur serait d'utiliser des vecteurs viraux pour transfecter la rétine du rat avec des formes modifiées de tau chez lequel différents résidus sérines et thréonines, incluant Ser199, Ser396/Ser404, auront été substitués par des acides aminés apolaires et non phosphorylables tel que la glycine ou l'alanine. Ainsi les nouveaux résidus ne pouvant être modifiée par les kinases, on obtiendra une sorte de tau pseudo-hypophosphorylée. On pourra également introduire dans la rétine murine, toujours par transfection virale, des formes mutantes de tau chez laquelle les même sérines et thréonines auront cette fois été remplacés par des acides aminés acides tels que le glutamate ou l'aspartate. Une telle substitution en augmentant la charge négative de la protéine au pH cellulaire, permet de mimer les effets de la phosphorylation à la seule différence qu'ici les effets restent permanents; on parlera alors de tau pseudo-hyperphosphorylée. On pourra ensuite induire le glaucome chez les animaux ainsi traités afin de déterminer les rôles respectifs de l'hyperphosphorylation et de l'hypophosphorylation de tau sur son oligomérisation et son accumulation, et ceci pour chacun des résidus considérés. Il est intéressant de noter que dans les cultures primaires de neurones de



l'hippocampe, la substitution des résidus Ser396 et Ser404 par l'acide glutamique stimule l'accumulation de tau dans les épines dendritiques, un effet qui est abrogé quand la sérine est remplacée par l'alanine (Xia et al., 2015). Ainsi, il apparaît que l'hyperphosphorylation de tau sur Ser396, Ser404 que nous avons décrit tantôt dans la rétine glaucomateuse contribue aussi à la redistribution somatodendritique de la protéine. Les expériences de transfection de tau mutante que nous venons de proposer permettront également de spécifier *in vivo*, la contribution de l'hyperphosphorylation/hypophosphorylation des résidus Ser199, 396 et 404 sur la redistribution de tau.

#### **5.4 Troubles de la protéostasie et pertes fonctionnelles chez les cellules ganglionnaires**

L'accumulation de tau dans les CGR est évocatrice d'anomalies dans le contrôle de la protéostasie. Nous avons vu dans le premier chapitre, les principaux mécanismes de contrôle de la l'homéostasie des protéines, notamment le contrôle de la qualité faisant recours aux chaperons, le contrôle de la quantité assuré par le SUP et l'autophagie, et le contrôle de la répartition régulé par le transport et le tri cellulaire. Comparativement aux autres neurones rétiniens, le contrôle de la distribution des protéines représente un mécanisme protéostatique extrêmement important pour les CGR. En effet, ayant un très long prolongement axonal et une importante arborisation dendritique, il est impératif pour la cellule ganglionnaire d'assurer correctement le tri et le transport de ses constituants cellulaires entre ces différents compartiments. De telle sorte que la moindre altération dans ce processus de répartition pourrait avoir des conséquences catastrophiques pour les CGR. Il se trouve justement que dans le glaucome, la baisse du transport axonal antérograde représente la première manifestation

pathologique de la maladie (Crish et al., 2010). Partant de ce constat nous nous sommes demandé si des anomalies dans le transport axonal pourraient être la cause de l'altération de la distribution de tau.

Pour répondre à cette question, nous avons étudié le transport axonal antérograde au sein des CGR. Pour cela les sujets 3xTg et sauvages ont été préalablement traitée par voie intraoculaire avec la sous-unité  $\beta$  de la toxine cholérique (CT $\beta$ ) liée au fluorophore Alexa -488. À 72 h post-injection, le colliculus supérieur, relais postsynaptique des CGR dans le cerveau, a été collecté afin de mesurer le niveau de fluorescence. Normalement après un tel traitement, il se produit chez la souris sauvage une forte accumulation de CT $\beta$  dans le colliculus supérieur, preuve que les CGR ont bien transporté la molécule vers leur destination finale. Par contre chez les sujets 3xTg, nous avons noté à 3 et 6 mois une baisse drastique d'environ 55 % du transport axonal antérograde, ce qui est révélateur de graves anomalies fonctionnelles chez les CGR. En outre, nous démontrons qu'à 3 mois et ce comparativement aux contrôles du même âge, le transport antérograde axonal est extrêmement lent chez les CGR 3xTg vu que 24 h post-traitement il n'y avait quasiment pas de CT $\beta$  qui soit arrivé à destination. Ces perturbations dans le fonctionnement des cellules ganglionnaires apparaissent très tôt dans le processus pathologique, alors que la mort neuronale n'est pas encore manifeste. Ceci indique que ces troubles fonctionnels font partie de l'ensemble des changements pathologiques précoces qui aboutiront à la neurodégénérescence.

De manière importante pour cette discussion, le groupe d'Eva-Maria Mandelkow et Eckhard Mandelkow démontre que l'expression préférentielle de tau dans les axones est assurée par le SIA qui permet le passage antérograde de tau du soma vers les axones tout en bloquant son mouvement rétrograde (Li et al., 2011). Par conséquent suite à la baisse du transport antérograde

que nous avons décrit chez les CGR, tau une fois traduite n'est pas acheminé vers les régions distales de l'axone, mais s'accumule plutôt dans le compartiment somatodendritique. De manière intéressante, une baisse similaire du transport axonal antérograde chez les CGR a été décrite dans le modèle murin de démence fronto-temporale qui surexprime la mutation P301S de tau (Gasparini et al., 2011; Bull et al., 2012). Toutefois, notre thèse apporte pour la première fois à notre connaissance, la preuve de l'altération du transport axonal dans les CGR du modèle animal de la MA.

Cependant, une question demeure. Comment expliquer que dans l'axone de la cellule ganglionnaire 3xTg, le niveau de tau soit réduit dans la partie extrarétinienne, mais élevée dans la partie intraoculaire ? Cette observation peut s'expliquer lorsqu'on considère le segment intrarétinien de l'axone, qui somme toute ne représente qu'une petite fraction de l'axone entier, comme équivalent au SIA. Ainsi, la protéine tau en cours d'accumulation dans le pôle somatodendritique bien que ne pouvant être transportée activement vers les régions plus distales de l'axone peut néanmoins diffuser passivement sur la courte distance couverte par le fragment axonal intrarétinien. En fin de compte, il y a un amoncellement de tau dans la partie de l'axone comprise dans la rétine au même moment que se produit la déplétion de la protéine dans l'extrémité distale située hors de l'œil. Au final, le dysfonctionnement du transport axonal antérograde dans les CGR provoque une dérégulation de la distribution cellulaire de tau telle que décrite ci-dessus.

La chute du transport antérograde peut s'expliquer de plusieurs façons. i) La présence chez les sujets 3xTg de la mutation P301L, fait en sorte que tau a une moindre affinité pour les microtubules. Par conséquent, les microtubules sont moins stables ce qui provoque des effets catastrophiques sur le cytosquelette et le transport axonal général (antérograde et rétrograde). Le

fait que le niveau de tau dans les axones du nerf optique soit considérablement réduit supporte fortement ce scénario dans la mesure où les microtubules axonaux dépourvus de tau ne pourront plus assurer correctement le transport axonal. ii) De plus, la surexpression de tau humain chez la souris en augmentant la quantité de tau monomérique engendre une compétition de tau avec la kinésine, moteur moléculaire antérograde, pour la liaison aux microtubules. La kinésine qui sort perdant de la compétition se sépare des microtubules, ce qui réduit le transport antérograde (Seitz et al., 2002). iii) Par ailleurs, la perte de la distribution de tau peut aussi se faire en réponse à une altération de sa phosphorylation qui la rend incapable de répondre correctement aux mécanismes de tri cellulaire (Li et al., 2011; Zempel and Mandelkow, 2015). Chez les animaux glaucomateux il est en l'occurrence montré que l'inhibition de p38 MAPK réduit la phosphorylation de tau dans la rétine ce qui prévient la dégradation du transport antérograde chez les cellules ganglionnaires (Dapper et al., 2013). De ce qui précède, il s'ensuit que les changements de phosphorylation de tau que nous présentons dans cette thèse militent en faveur de leur implication dans la baisse du transport antérograde des CGR tant glaucomateuses qu'alzheimériennes. Il n'est pas exclu que l'accumulation de tau se fasse indépendamment de l'altération du transport axonal. Dans ce cas l'agrégation de tau dans les cellules ganglionnaires en piégeant la protéine normale dans le cytosol empêcherait la stabilisation des microtubules requise pour le transport cellulaire.

Il est aussi possible que la redistribution de tau vers le compartiment intrarétinien de la cellule ganglionnaire résulte aussi de la hausse du transport axonal rétrograde. En effet, il est montré que la surexpression de tau dans le neurone en augmentant la quantité de tau disponible dans le neurone submerge et rompt la barrière du SIA. Conséquence de cette rupture, la protéine tau axonale peut désormais être transportée de manière rétrograde vers le compartiment

somatodendritique (Li et al., 2011) pour s'y entasser. Néanmoins, un tel mécanisme est en contradiction avec les données issues de souris P301S qui montrent une baisse du transport axonal rétrograde chez les cellules ganglionnaires (Bull et al., 2012).

Enfin, l'altération de la distribution de tau peut aussi être le produit du dysfonctionnement des mécanismes de contrôle de la quantité de la protéine. Il est en l'occurrence montré dans les modèles de tauopathie que l'agrégation de tau est associée à la baisse de l'activité protéolytique du protéasome 26S et au dysfonctionnement de l'autophagie (Wang and Mandelkow, 2012; Lee et al., 2013; Myeku et al., 2016). Par conséquent, la diminution de la protéolyse de tau préférentiellement dans le compartiment intrarétinien des cellules ganglionnaires pourrait déboucher sur un enrichissement de la protéine dans cette région au détriment de son équivalent extraoculaire. Il serait intéressant de déterminer si la dérégulation de l'autophagie, contribue à l'accumulation de tau dans la rétine lors du glaucome et de la MA. Une façon de répondre à cette question serait de moduler l'autophagie, soit par répression de la voie mTOR avec la rapamycine (ce qui stimule l'autophagie), soit par inactivation du ligand LC3 de l'autophagie à l'aide d'ARN d'interférences (ce qui inhibe l'autophagie). Dans les deux cas, l'expression rétinienne de tau pourra être analysée par western blot et les effets sur la survie des neuronale pourront être mesurés par quantification des CGR.

De plus étant donné l'importance cruciale des protéines chaperonnes pour la protéostasie, il serait intéressant de déterminer si elles contribuent à l'agglomération de la protéine tau rétinienne que nous décrivons dans cette thèse. Une façon de répondre à cette problématique dans le cas de la MA serait de croiser des souris Knock out pour le chaperon HSP70, avec des souris 3xTg afin de produire des souris 3xTg-HSP70 KO. L'intérêt d'utiliser le chaperon HSP70

est que son cycle de fonctionnement est très bien caractérisé, de plus les souris knock out pour cette protéine sont disponibles (Kim et al., 2006). Ainsi si l'altération du contrôle qualité des protéines contribue à la tauopathie, on devrait s'attendre à ce que la délétion de HSP70 exacerbe l'accumulation de tau dans la rétine 3xTg et complique d'avantage les déficits fonctionnels dans les cellules ganglionnaires. Suivant la même logique, si la baisse de fonction de HSP70 contribue à l'augmentation de la tau rétinienne lors du glaucome, alors sa suppression à l'aide d'ARN d'interférences (administrés par transfection virale) devrait amplifier l'accumulation de tau dans la rétine, et aggraver la perte des CGR.

## **5.5 Le glaucome comme tauopathie : implications thérapeutiques**

Selon un adage populaire, « la vue c'est la vie ! ». Cette maxime est d'autant plus vraie lorsqu'on est atteint du glaucome, qui survient sans crier gare pour dérober subrepticement la vue. Et c'est un spectacle affligeant que celui de la détresse des patients condamnés à une cécité inexorable auquel rien ne peut remédier étant donné qu'il n'y a pas de remède contre ce fléau. Certes, des traitements visant à réduire pharmacologiquement ou chirurgicalement l'HTO ont été testés avec plus ou moins de succès (Lichter et al., 2001; Heijl et al., 2002). Cependant, ces interventions même lorsqu'elles ralentissent la progression de la maladie ne stoppent pas pour autant la perte du champ visuel (Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study, 1998; AGIS, 2000), ce qui prouve que la seule correction de l'HTO ne suffit guérir du glaucome. À cela s'ajoute le fait que la pathologie glaucomateuse peut survenir alors que la pression intraoculaire reste normale. Tout ceci révèle la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques indépendantes du contrôle de la pression intraoculaire.

Nous montrons dans cette thèse que le glaucome présente les caractéristiques d'une tauopathie et qu'à ce titre la protéine tau représente une cible thérapeutique intéressante pour le traitement du glaucome. Nos résultats révèlent en effet que la diminution de tau à l'aide d'ARN d'interférence dirigés contre sa transcription augmente la survie du soma et des axones des CGR. Il faut souligner que cet effet fut obtenu nonobstant l'HTO persistante. Ceci prouve donc que l'effet neuroprotecteur du traitement anti-tau se fait indépendamment de la correction de la pression intraoculaire. La réduction de l'expression génique de tau dans la rétine en réduisant le pool endogène de la protéine dans le tissu permet de prévenir l'accumulation et l'oligomérisation de tau. D'un autre côté, les problèmes éventuels qui pourraient découler de l'altération de la phosphorylation de la protéine sont prévenus puisque la quantité de la protéine totale pouvant servir de substrat aux kinases et phosphatases est réduite.

L'administration d'ARN d'interférence anti-tau par injection intraoculaire s'est avérée être une stratégie pertinente dans la mesure où elle nous a permis d'obtenir une importante réduction de l'expression de tau dans la CPI et la CCG. Ces couches sont non seulement celles qui renferment les dendrites et les somas des cellules ganglionnaires, mais aussi celles où la hausse de tau est la plus importante. Ceci indique qu'en utilisant l'approche de délétion par ARN d'interférence, nous avons pu cibler de préférence la protéine tau s'accumulant dans les CGR ; ce fait est très important surtout lorsqu'on tient compte du fait que ces neurones constituent la seule population cellulaire atteinte lors du glaucome. La stratégie de réduction de l'expression protéique par ARN d'interférence produit généralement une délétion partielle et transitoire de la protéine cible. Dans le cas qui nous concerne, nous n'avons effectivement pas supprimé la totalité de la protéine tau rétinienne, mais juste réduit l'excédent provenant de son accumulation. Contrairement à une inactivation totale de tau, cette approche permet donc de préserver

l'expression basale de la protéine dans le soma et les dendrites des CGR. Or cette expression basale de tau est requise pour la transmission synaptique (Ittner et al., 2010; Roberson et al., 2011) et pour la signalisation intracellulaire normale (Lee et al., 1998; Zamora-Leon et al., 2001). Il émerge de nos expériences que l'utilisation d'ARN d'interférences contre tau, permet de réduire la toxicité liée à l'excédent de la protéine dans le compartiment somatodendritique tout en préservant l'expression basale requise pour la physiologie cellulaire.

Bien que nos expériences de survie apportent des preuves au principe selon lequel tau constitue une cible de choix pour le traitement du glaucome, utiliser des ARN d'interférence pour corriger l'accumulation de tau n'est pas une solution idéale, du moins du point de vue clinique, en raison des effets pléiotropiques d'une telle approche. En effet, les ARN d'interférence anti-tau peuvent aussi agir sur les autres cellules de la rétine pourtant non impliquées dans le glaucome et y produire des effets indésirables. Qui plus est dans les CGR, ces agents biochimiques ne permettent pas de discriminer les effets pathologiques de tau de l'activité physiologique de la protéine. C'est pour ces raisons qu'il est impératif d'élucider les mécanismes de neurotoxicité de tau afin d'identifier des cibles en aval exploitables cliniquement. Une cible particulièrement intéressante est l'interaction de tau avec la kinase Fyn qui sert d'intermédiaire à l'effet régulateur, et toxique le cas échéant, de tau sur la transmission glutamatergique (Ittner et al., 2010; Ittner and Gotz, 2011; Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Il est possible que l'accumulation de tau que nous décrivons ici dans les dendrites des CGR augmente la localisation de Fyn dans les dendrites ce qui provoque une activation excessive des récepteurs NMDA avec comme conséquence la perte des neurones par excitotoxicité. Un argument en faveur de ce schéma est l'étude de Bull et al. qui montre que comparativement aux souris sauvages, l'administration de faibles doses de NMDA dans la rétine de souris P301L augmente



la mort des CGR par excitotoxicité. Nous avons justement des données préliminaires qui montrent que l'accumulation de tau dans la rétine glaucomateuse est associée à une hausse de l'expression de Fyn dans les couches des dendrites des CGR. En outre, nous avons constaté que la diminution de tau à l'aide d'ARN d'interférence permet d'abroger la hausse de Fyn, supportant ainsi l'hypothèse selon laquelle Fyn est un médiateur de la neurotoxicité de tau (voir annexe B).

## **5.6 Diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer : la protéine tau rétinienne pour y voir plus clair ?**

Il a été proposé que les changements survenant dans les phases précoces de la MA pourraient être réversibles si les interventions thérapeutiques sont effectuées rapidement (De Strooper and Karran, 2016). Le problème c'est que les outils diagnostiques dont disposent les cliniciens manquent de sensibilité et de spécificité pour détecter et suivre efficacement ces changements durant la phase présymptomatique ou prodromale de la maladie. Prenons le cas de techniques de neuroimagerie structurale telles que la tomодensitométrie ou l'imagerie par résonance magnétique. Leur rôle est le plus souvent limité à l'évaluation du niveau d'atrophie cérébrale et à l'exclusion d'autres pathologies comme cause de la démence (Johnson et al., 2012). Des avancées ont certes été réalisées depuis lors avec notamment la mise au point du composé de Pittsburgh qui permet l'identification des plaques amyloïde dans le cerveau des patients par PET-Scan (Klunk et al., 2004; Johnson et al., 2012). De même le traceur radioactif [<sup>18</sup>F]-AV-1451 qui permet d'identifier les enchevêtrements neurofibrillaires par PET-scan a été récemment développé (Scholl et al., 2016; Schwarz et al., 2016). Mais en dépit de cela, le même problème subsiste : les plaques séniles et les enchevêtrements apparaissent relativement tard dans

le processus pathologique. Ainsi, ces techniques quoique révolutionnaires pour le diagnostic de la MA sont limitées lorsqu'il est question d'identifier des patients se trouvant encore dans la phase présymptomatique ou prodromale de l'affection. Il en résulte que le mince éventail de traitements actuellement disponibles survient très souvent trop tard pour arrêter ou du moins ralentir l'affection. Ceci pourrait aussi expliquer en partie pourquoi les essais cliniques contre la MA se sont tous soldés par des échecs. La même problématique du diagnostic précoce s'applique aussi au glaucome où les phases présymptomatiques de la maladie passent le plus souvent inaperçus, de telle sorte que lorsque les déficits visuels sont détectés, le processus pathologique se trouve à un stade trop avancé pour être corrigé. Ces faits illustrent donc l'urgence de développer des approches novatrices permettant le diagnostic précoce de la MA et du glaucome.

Nos résultats montrent que chez le modèle murin de la MA, la hausse de tau dans la rétine précède celle de l'hippocampe et du néocortex. Ceci indique que les mécanismes pathologiques à l'origine de l'accumulation de tau surviennent en premier lieu dans la rétine. Si l'on ajoute à cela le fait que dans la rétine 3xTg les troubles fonctionnels des CGR arrivent dès l'âge de 3 mois, c'est-à-dire bien avant l'apparition des premiers troubles cognitifs, on arrive rapidement à la conclusion que la rétine est plus sensible que le cerveau lorsqu'il s'agit de refléter des manifestations subtiles de la pathologie alzheimerienne. Cette propriété unique de la rétine peut être exploitée pour mettre sur pied de nouveaux outils diagnostiques de la MA. Dans cette optique, nous proposons que la protéine tau rétinienne puisse servir de biomarqueur précoce et fiable de la MA, du glaucome, et des tauopathies en général. À ce titre, l'observation de la protéine tau rétinienne pourrait permettre de détecter la hausse de son niveau dans le SNC bien avant que cela n'ait eu le temps de se manifester dans le cerveau. Cette approche tient compte du fait que la rétine est une partie intégrale du cerveau et qu'à ce titre elle reflète fidèlement les

changements cellulaires et moléculaires qui surviennent dans cet organe (London et al., 2013). L'utilisation de la protéine tau rétinienne comme biomarqueur permettra non seulement d'identifier rapidement les patients à risque de développer la MA afin de leur accorder les soins appropriés, mais aussi d'évaluer l'efficacité de traitements visant à éliminer les agrégats de tau dans le cerveau. L'étude remarquable de Schön et al. démontre élégamment la faisabilité d'une telle approche (Schön et al., 2012). Les auteurs montrent notamment qu'il est possible de suivre longitudinalement la formation d'agrégats de tau dans la rétine de souris P301S par ophtalmoscopie à balayage laser. Pour visualiser la formation d'agrégats, les auteurs ont traité les souris avec le FSB [(E, E)-1-Fluoro-2,5-bis(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)StyrylBenzene], un agent fluorescent qui se fixe aux agrégats de tau anormalement repliés ; ce qui leur a permis de visualiser la formation des enchevêtrements dans la rétine, et ce sur plusieurs mois. Ils ont ensuite confirmé ex vivo par immunomarquage que le signal qu'ils observaient était effectivement celui d'agrégats de tau (Schön et al., 2012). Nos travaux indiquent également que l'examen de tau dans la rétine par ophtalmoscopie peut aussi aider dans l'identification de patients à risque de développer le glaucome.

## **5.7 Limites de l'étude**

En dépit de sa contribution dans l'avancée des connaissances sur les désordres rétiens, les travaux présentés dans cette thèse présentent quelques limites qu'il est important d'évoquer. Dans notre étude sur le glaucome nous n'avons pas déterminé si la hausse de la survie des CGR suivant à la réduction de tau s'accompagne de récupérations fonctionnelles. Ceci est d'une importance capitale, car tout compte fait c'est la capacité de ces derniers à fonctionner correctement et non le nombre ayant survécu qui indique véritablement si le ciblage de tau

présente un intérêt thérapeutique. Une façon de répondre à cette question serait l'étude chez les CGR du transport axonal après réduction de l'expression de tau. On pourrait aussi étudier le fonctionnement des CGR par électrorétinographie afin de déterminer si la délétion de tau induit une amélioration de la réponse photopique négative ou une hausse de l'amplitude des potentiels visuels évoqués.

Les souris 3xTg utilisées dans cette thèse expriment la mutation humaine tau P301L. Cependant, cette mutation correspond plutôt à la DFTP-17 tandis qu'aucune anomalie génétique de tau n'a été identifiée jusqu'ici chez les patients atteints de la MA. Donc nous ne pouvons déterminer si les dysfonctionnements que nous avons observés chez les cellules ganglionnaires 3xTg résultent uniquement de l'introduction du gène mutant de tau, ou si des anomalies de tau endogène (comme c'est le cas dans la MA) sont également capables d'engendrer de tels effets.

De surcroît, nous n'avons pas établi s'il existe un lien direct entre la surexpression de tau et le dysfonctionnement des CGR chez les sujets 3xTg. Il faut en effet se rappeler que ces souris expriment également les mutations humaines de l'APP et de la PS1 qui stimulent la synthèse de l'A $\beta$ . Il a d'ailleurs été montré que chez les souris APP/PS1 il y a une accumulation d'A $\beta$  dans la rétine. Ces animaux présentent une diminution de l'amplitude du seuil de réponse scotopique, un autre indicateur de la fonction des cellules ganglionnaires combinée à une dégénérescence de ces derniers (Gupta et al., 2016). Ceci illustre donc le fait que la surexpression d'A $\beta$  de manière intrinsèque exerce un effet toxique sur les CGR. C'est pourquoi il est important de déterminer la contribution propre de tau au dysfonctionnement des CGR. À cet effet, on pourrait par exemple réduire la charge protéique de tau dans la rétine par injection intraoculaire d'ARN d'interférences anti-tau (administré directement ou via des vecteurs viraux), afin de déterminer si

cette baisse permet d'abroger le déficit de transport axonal et d'améliorer la survie des neurones. Précisons néanmoins qu'il est désormais établi que tau est un important médiateur de la toxicité d'A $\beta$  (Santacruz et al., 2005; Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010). Ce qui signifie que même dans le cas éventuel où l'A $\beta$  serait impliqué dans la perte des CGR 3xTg, cet effet nécessite en fin de compte la participation de tau. Sachant cela nous pouvons affirmer que l'accumulation de tau dans la rétine 3xTg contribue substantiellement au dysfonctionnement et à la dégénérescence des cellules ganglionnaires.

## **5.8 La rétine comme modèle d'étude des tauopathies : perspectives pour la recherche**

La rétine est une projection du cerveau souvent écrite comme étant une fenêtre ouverte sur le système nerveux central. Ceci est d'autant plus vrai que l'intérieur de l'œil étant transparent, il est facile de visualiser la rétine afin d'y déceler l'irruption éventuelle de processus pathologiques se déroulant dans le cerveau. Nous avons montré dans cette thèse que ce concept s'applique aussi aux tauopathies, puisque dans la rétine la protéine tau manifeste les mêmes changements que ceux survenant dans le cerveau. Un sujet qui fait l'objet d'intenses investigations concerne le mécanisme de propagation transsynaptique de tau. La rétine grâce à son organisation hautement stratifiée constitue un outil unique pour l'étude *in vivo* de cette problématique. Dans cette optique la protéine tau liée à un reporteur (LacZ ou GFP) peut être exprimée uniquement dans les cellules ganglionnaires en le plaçant sous le contrôle du promoteur Thy-1, de manière à suivre la propagation de la protéine à travers les relais synaptiques situés en aval ou en amont. Si la propagation est rétrograde, on devrait s'attendre à trouver une accumulation de la protéine dans les couches plexiformes et nucléaires de la rétine.

Si par contre la propagation se fait de manière antérograde alors tau va s'agréger dans les neurones du colliculus supérieur puis du cortex visuel. Le système rétinien pourra également permettre d'étudier les voies de sécrétions impliquées dans la propagation de la protéine tau. Curieusement nous avons constaté que dans la rétine glaucomateuse, en plus des CGR, tau s'accumule aussi dans les neurones bipolaires et les cellules amacrines. Ceci est particulièrement intéressant étant donné que ces deux derniers neurones, établissent des contacts synaptiques avec les CGR. Il semble donc que la hausse de la protéine survenant initialement dans les CGR est libérée dans le milieu extracellulaire puis se propage de manière transsynaptique vers les neurones bipolaire et amacrines. Cette observation est en accord avec le modèle de propagation transsynaptique de tau décrit par les équipes de Bradley Hyman et Karen Duff (de Calignon et al., 2012; Liu et al., 2012).

Une autre question hautement débattue concerne les mécanismes de redistribution de tau. La nette compartimentation anatomique de la cellule ganglionnaire, avec sa zone somatodendritique située dans la rétine et son long prolongement axonal majoritairement inclus dans le nerf optique, constitue un atout unique pour l'étude mécanistique de la délocalisation de tau. Par exemple l'inactivation de la dynéine, un moteur moléculaire rétrograde, par ARN d'interférence dans la rétine, pourra permettre de déterminer si le transport rétrograde est impliqué dans la perturbation de la distribution de la protéine. La modulation de la voie de signalisation mTOR, régulatrice de l'autophagie, permettra de déterminer si la redistribution somatodendritique de tau est le fruit d'une altération de l'autophagie. De même, l'expression dans les CGR de formes chimériques de tau constitués des différents domaines (domaine de projection, domaine de liaison aux microtubules, domaine riche en proline) pourra permettre

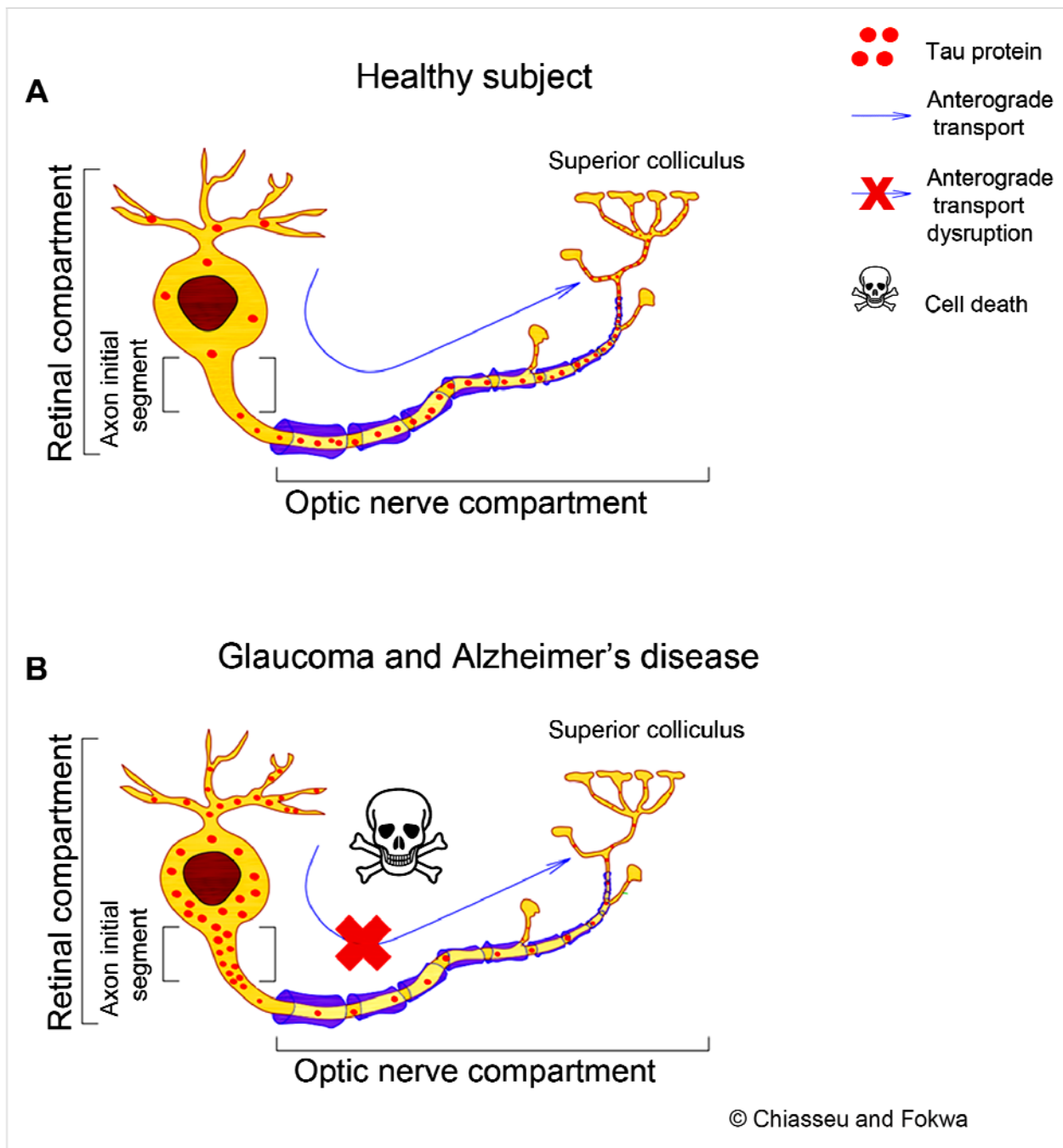
d'étudier *in vivo* le rôle de ces différentes régions dans la redistribution pathologique de la protéine.

## **5.9 Modèle récapitulatif et conclusion**

Avant de clore cette discussion, nous allons présenter un modèle unifié permettant de récapituler les données obtenues au cours de nos 5 années investigations. Dans la rétine normale, tau est faiblement exprimé dans les dendrites, le soma et le segment non myélinisé des axones des CGR. Par contre, la protéine est fortement exprimée dans le segment myélinisé des axones inclus dans le nerf optique (Figure 1A). Cette répartition distincte serait due au segment axonal intrarétinien qui permet le passage unidirectionnel de tau traduit du soma vers l'axone distal. Seulement, il peut advenir que pour diverses raisons telles que l'HTO dans le cas du glaucome ou le dysfonctionnement de tau et des microtubules dans le cas de la MA, le transport axonal antérograde soit perturbé. Dans ce cas, la protéine une fois traduite reste bloquée dans la zone intraoculaire de la cellule avec comme conséquence la baisse de l'expression de la protéine dans le segment de l'axone compris dans le nerf optique. Dans la portion intrarétinienne des CGR, tau s'accumule progressivement et subit des modifications de phosphorylation, probablement sous l'influence des kinases et les phosphatases, qui favorisent son oligomérisation. L'agglomération de tau peut être également initié par des mécanismes indépendants du transport axonal, telle que altération de l'autophagie par exemple, et en retour provoquer la dégradation du transport axonal. Dans tous les cas une fois installée, l'accumulation de la protéine se solde par la perte des CGR (Figure 1B). Des études futures permettront d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de la toxicité de tau dans la rétine.

En essence nous avons démontré dans cette thèse que les rétines glaucomateuses et alzheimeriennes présentent les caractéristiques cardinales des tauopathies à savoir l'accumulation, la phosphorylation anormale et l'altération de la distribution de tau le tout culminant en la perte de fonction et la dégénérescence des CGR. Nous pouvons donc affirmer en guise de conclusion que les dysfonctionnements de la protéine tau jouent un rôle crucial dans la perte des CGR, faisant de cette protéine une cible thérapeutique de choix.





**Figure 1. Modèle récapitulatif de la thèse.** A) Dans les conditions normales, tau une fois traduite dans le compartiment somatodendritique de la CGR est transportée de manière antérograde vers le segment axonal myélinisé situé dans le nerf optique; ce qui induit une expression préférentielle de tau dans le segment extrarétinien du neurone. B) Dans le glaucome et la MA, le transport antérograde est altéré dans la cellule ganglionnaire, de telle sorte que tau traduite dans le péricaryon ne peut être acheminée vers l'axone distal. Il s'ensuit une accumulation de la protéine dans la partie intrarétinienne du neurone (dendrites, soma et segment axonal initial non myélinisé), ce qui engendre la perte des CGR.

## BIBLIOGRAPHIE

- Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW, Kuret J, Binder LI (2000) C-terminal inhibition of tau assembly *in vitro* and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci* 113 Pt 21:3737-3745.
- Abe T, Matsumura S, Katano T, Mabuchi T, Takagi K, Xu L, Yamamoto A, Hattori K, Yagi T, Watanabe M, Nakazawa T, Yamamoto T, Mishina M, Nakai Y, Ito S (2005) Fyn kinase-mediated phosphorylation of NMDA receptor NR2B subunit at Tyr1472 is essential for maintenance of neuropathic pain. *The European journal of neuroscience* 22:1445-1454.
- Abu-Amero KK, Morales J, Bosley TM (2006) Mitochondrial Abnormalities in Patients with Primary Open-Angle Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47:2533-2541.
- AGIS (2000) The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. the relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *American Journal of Ophthalmology* 130:429-440.
- Agostinone J, Di Polo A (2015) Retinal ganglion cell dendrite pathology and synapse loss: implications for glaucoma. *Prog Brain Res* 220:199-216.
- Ahmed Z, Kalinski H, Berry M, Almasieh M, Ashush H, Slager N, Brafman A, Spivak I, Neeha Prasad I N, Mett I, Shalom E, Alpert E, Di Polo A, Feinstein E, Logan A (2011) Ocular neuroprotection by siRNA targeting caspase-2. *Cell Death Dis* 2:e173.
- Airaksinen PJ, Tuulonen A, Alanko HI (1992) Rate and pattern of neuroretinal rim area decrease in ocular hypertension and glaucoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 110:206-210.
- Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE (2008a) Frequent Amyloid Deposition Without Significant Cognitive Impairment Among the Elderly. *Archives of neurology* 65:1509-1517.
- Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi WZ, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE (2008b) Frequent Amyloid Deposition Without Significant Cognitive Impairment Among the Elderly. *Archives of Neurology* 65:1509-1517.

- Al-Bassam S, Xu M, Wandless TJ, Arnold DB (2012) Differential trafficking of transport vesicles contributes to the localization of dendritic proteins. *Cell Reports* 2:89-100.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2011) *Biologie moléculaire de la cellule*, 5ème Edition. Lavoisier Medecine-sciences.
- Alexandrescu C, Dascalu AM, Panca A, Sescioreanu A, Mitulescu C, Ciuluvica R, Voinea L, Celea C (2010) Confocal scanning laser ophthalmoscopy in glaucoma diagnosis and management. *Journal of Medicine and Life* 3:229-234.
- Almasieh M, Zhou Y, Kelly ME, Casanova C, Di Polo A (2010) Structural and functional neuroprotection in glaucoma: role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell death & disease* 1:e27.
- Almasieh M, Wilson AM, Morquette B, Cueva Vargas JL, Di Polo A (2012) The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal and Eye Research* 31:152-181.
- Almasieh M, MacIntyre JN, Pouliot M, Casanova C, Vaucher E, Kelly MEM, Di Polo A (2013) Acetylcholinesterase inhibition promotes retinal vasoprotection and increases ocular blood flow in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:3171-3183.
- Almeida CG, Tampellini D, Takahashi RH, Greengard P, Lin MT, Snyder EM, Gouras GK (2005) Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiology of Disease* 20:187-198.
- Alonso AdC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2:783-787.
- Alonso AdC, Zaidi T, Novak M, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Hyperphosphorylation induces self-assembly of  $\tau$  into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:6923-6928.
- Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739:91-103.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human .tau. gene. *Biochemistry* 31:10626-10633.

- Angelucci A, Clasca F, Sur M (1996) Anterograde axonal tracing with the subunit B of cholera toxin: a highly sensitive immunohistochemical protocol for revealing fine axonal morphology in adult and neonatal brains. *Journal of neuroscience methods* 65:101-112.
- Armaly MF, Krueger DE, Maunder L, et al. (1980) Biostatistical analysis of the collaborative glaucoma study: I. summary report of the risk factors for glaucomatous visual-field defects. *Archives of Ophthalmology* 98:2163-2171.
- Arnold CS, Johnson GVW, Cole RN, Dong DL-Y, Lee M, Hart GW (1996) The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* 271:28741-28744.
- Aronov S, Aranda G, Behar L, Ginzburg I (2001) Axonal Tau mRNA Localization Coincides with Tau Protein in Living Neuronal Cells and Depends on Axonal Targeting Signal. *The Journal of Neuroscience* 21:6577-6587.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
- Asai M, Hattori C, Szabo B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301:231-235.
- Ashe KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66:631-645.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 281:1305-1308.
- Augustinack J, Schneider A, Mandelkow E, Hyman B (2002a) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 103:26-35.
- Aviles-Trigueros M, Mayor-Torroglosa S, Garcia-Aviles A, Lafuente MP, Rodriguez ME, Miralles de Imperial J, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2003) Transient ischemia of the retina results in massive degeneration of the retinotectal projection: long-term neuroprotection with brimonidine. *Exp Neurol* 184:767-777.
- Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting Proteostasis for Disease Intervention. *Science* 319:916-919.

- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, Bastone A, Scip A, Biasini E, Tapella L, Colombo L, Manzoni C, Borsello T, Chiesa R, Gobbi M, Salmona M, Forloni G (2010) Synthetic amyloid-beta oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2295-2300.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8:663-672.
- Barron MJ, Griffiths P, Turnbull DM, Bates D, Nichols P (2004) The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head. *British Journal of Ophthalmology* 88:286-290.
- Bayer AU, Ferrari F, Erb C (2002) High occurrence rate of glaucoma among patients with Alzheimer's disease. *European neurology* 47:165-168.
- Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM, Deane R, Zlokovic BV (2007) Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27:909-918.
- Bengtsson B (1981) The prevalence of glaucoma. *The British journal of ophthalmology* 65:46-49.
- Berry RH, Qu J, John SWM, Howell GR, Jakobs TC (2015) Synapse Loss and Dendrite Remodeling in a Mouse Model of Glaucoma. *PLoS ONE* 10:e0144341.
- Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT (2010) Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 68:19-31.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-163.
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E, Meijer L, Mandelkow EM (2002) Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13:4013-4028.

- Biernat J, Mandelkow EM, Schroter C, Lichtenberg-Kraag B, Steiner B, Berling B, Meyer H, Mercken M, Vandermeeren A, Goedert M, et al. (1992) The switch of tau protein to an Alzheimer-like state includes the phosphorylation of two serine-proline motifs upstream of the microtubule binding region. *The EMBO journal* 11:1593-1597.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45:675-688.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW (2005) Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1739:216-223.
- Blanks JC, Hinton DR, Sadun AA, Miller CA (1989) Retinal ganglion cell degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res* 501:364-372.
- Blanks JC, Torigoe Y, Hinton DR, Blanks RH (1996a) Retinal pathology in Alzheimer's disease. I. Ganglion cell loss in foveal/parafoveal retina. *Neurobiol Aging* 17:377-384.
- Blanks JC, Schmidt SY, Torigoe Y, Porrello KV, Hinton DR, Blanks RH (1996b) Retinal pathology in Alzheimer's disease. II. Regional neuron loss and glial changes in GCL. *Neurobiol Aging* 17:385-395.
- Blum-Degen D, Müller T, Kuhn W, Gerlach M, Przuntek H, Riederer P (1995) Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. *Neuroscience letters* 202:17-20.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron* 19:939-945.
- Bothwell M (2014) NGF, BDNF, NT3, and NT4. *Handbook of experimental pharmacology* 220:3-15.
- Boyne L, Tessler A, Murray M, Fischer I (1995) Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J Comp Neurol* 358:279-293.

- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta neuropathologica* 82:239-259.
- Braak H, Braak E (1995) Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiology of Aging* 16:271-278.
- Brandt R, Hundelt M, Shahani N (2005) Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta* 1739:331-354.
- Brigatti L, Nouri-Mahdavi K, Weitzman M, Caprioli J (1997) Automatic detection of glaucomatous visual field progression with neural networks. *Archives of Ophthalmology* 115:725-728.
- Buckley C, Hadoke PWF, Henry E, O'Brien C (2002) Systemic vascular endothelial cell dysfunction in normal pressure glaucoma. *The British journal of ophthalmology* 86:227-232.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain research Brain research reviews* 33:95-130.
- Buée L et al. (2010) From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death? *Biochemical Society Transactions* 38:967-972.
- Bull ND, Guidi A, Goedert M, Martin KR, Spillantini MG (2012) Reduced axonal transport and increased excitotoxic retinal ganglion cell degeneration in mice transgenic for human mutant P301S tau. *PLoS One* 7:e34724.
- Burack MA, Silverman MA, Banker G (2000) The Role of Selective Transport in Neuronal Protein Sorting. *Neuron* 26:465-472.
- Burkhart KK, Beard DC, Lehman RAW, Billingsley ML (1998) Alterations in tau phosphorylation in rat and human neocortical brain slices following hypoxia and glucose deprivation. *Exp Neurol* 154:464-472.
- Bussel, II, Wollstein G, Schuman JS (2014) OCT for glaucoma diagnosis, screening and detection of glaucoma progression. *The British journal of ophthalmology* 98 Suppl 2:ii15-19.

- Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R (2013) Amyloid  $\beta$ -Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression. *Antioxidants & Redox Signaling* 19:823-835.
- Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, Tang H, Sowell RA, Spilman P, Fombonne J, Gorostiza O, Zhang J, Sultana R, Bredesen DE (2010) *In vivo* oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP. *Free radical biology & medicine* 48:136-144.
- Caillet-Boudin M-L, Buee L, Sergeant N, Lefebvre B (2015) Regulation of human MAPT gene expression. *Mol Neurodegener* 10:28.
- Cairns NJ et al. (2007) Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 114:5-22.
- Calkins DJ (2012) Critical pathogenic events underlying progression of neurodegeneration in glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 31:702-719.
- Calkins DJ, Horner PJ (2012) The cell and molecular biology of glaucoma: axonopathy and the brain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:2482-2484.
- Caprioli J, Spaeth GL (1985) Comparison of the optic nerve head in high- and low-tension glaucoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 103:1145-1149.
- Carlier MF, Simon C, Cassoly R, Pradel LA (1984) Interaction between microtubule-associated protein tau and spectrin. *Biochimie* 66:305-311.
- Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J (1996) The Structural Basis of Monoclonal Antibody Alz50's Selectivity for Alzheimer's Disease Pathology. *Journal of Biological Chemistry* 271:32789-32795.
- Carrillo MC, Dean RA, Nicolas F, Miller DS, Berman R, Khachaturian Z, Bain LJ, Schindler R, Knopman D (2013) Revisiting the framework of the National Institute on Aging-Alzheimer's Association diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia* 9:594-601.



- Carroll JC, Rosario ER, Kreimer S, Villamagna A, Gentzschein E, Stanczyk FZ, Pike CJ (2010) Sex differences in beta-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res* 1366:233-245.
- Cartwright MJ, Anderson DR (1988) Correlation of asymmetric damage with asymmetric intraocular pressure in normal-tension glaucoma (low-tension glaucoma). *Archives of ophthalmology* (Chicago, Ill : 1960) 106:898-900.
- Ceglia I, Reitz C, Gresack J, Ahn JH, Bustos V, Bleck M, Zhang X, Martin G, Simon SM, Nairn AC, Greengard P, Kim Y (2015) APP intracellular domain-WAVE1 pathway reduces amyloid-beta production. *Nat Med* 21:1054-1059.
- Chai X, Dage JL, Citron M (2012) Constitutive secretion of tau protein by an unconventional mechanism. *Neurobiology of Disease* 48:356-366.
- Chakrabarti S, Sinha M, Thakurta IG, Banerjee P, Chattopadhyay M (2013) Oxidative stress and amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease: intervention in a complex relationship by antioxidants. *Current medicinal chemistry* 20:4648-4664.
- Chan EA, Buckley B, Farraj AK, Thompson LC (2016) The heart as an extravascular target of endothelin-1 in particulate matter-induced cardiac dysfunction. *Pharmacology & therapeutics*.
- Chauhan BC, LeVatte TL, Jollimore CA, Yu PK, Reitsamer HA, Kelly MEM, Yu D-Y, Tremblay Fo, Archibald ML (2004) Model of Endothelin-1-Induced Chronic Optic Neuropathy in Rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45:144-152.
- Chen H, Weber AJ (2004) Brain-derived neurotrophic factor reduces TrkB protein and mRNA in the normal retina and following optic nerve crush in adult rats. *Brain Research* 1011:99-106.
- Chen J, Miao Y, Wang X-H, Wang Z (2011) Elevation of p-NR2AS1232 by Cdk5/p35 contributes to retinal ganglion cell apoptosis in a rat experimental glaucoma model. *Neurobiology of Disease* 43:455-464.
- Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho EH, Lockett S, Dunlop NM, Wang JM (2006) Activation of Toll-like Receptor 2 on Microglia Promotes Cell Uptake of Alzheimer Disease-associated Amyloid  $\beta$  Peptide. *Journal of Biological Chemistry* 281:3651-3659.

- Cheng L, Sapielha P, Kittlerová P, Hauswirth WW, Di Polo A (2002) TrkB Gene Transfer Protects Retinal Ganglion Cells from Axotomy-Induced Death *In vivo*. *The Journal of Neuroscience* 22:3977-3986.
- Cheung CY-I, Ong YT, Ikram MK, Ong SY, Li X, Hilal S, Catindig J-AS, Venketasubramanian N, Yap P, Seow D, Chen CP, Wong TY (2014) Microvascular network alterations in the retina of patients with Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 10:135-142.
- Chiasseu M, Cueva Vargas JL, Destroismaisons L, Vande Velde C, Leclerc N, Di Polo A (2016) Tau Accumulation, Altered Phosphorylation, and Missorting Promote Neurodegeneration in Glaucoma. *The Journal of Neuroscience* 36:5785-5798.
- Chin J, Palop JJ, Puolivali J, Massaro C, Bien-Ly N, Gerstein H, Scarce-Levie K, Masliah E, Mucke L (2005) Fyn kinase induces synaptic and cognitive impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 25:9694-9703.
- Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M (2010) An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromolecular medicine* 12:1-12.
- Chrysostomou V, Rezanian F, Trounce IA, Crowston JG (2013) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Current Opinion in Pharmacology* 13:12-15.
- Chung HS, Harris A, Kagemann L, Martin B (1999) Peripapillary retinal blood flow in normal tension glaucoma. *The British journal of ophthalmology* 83:466-469.
- Cioffi GA, Orgul S, Onda E, Bacon DR, Van Buskirk EM (1995) An *in vivo* model of chronic optic nerve ischemia: the dose-dependent effects of endothelin-1 on the optic nerve microvasculature. *Curr Eye Res* 14:1147-1153.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
- Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, Winblad B, Venizelos N, Lannfelt L, Selkoe DJ (1994) Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of

- symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11993-11997.
- Clavaguera F, Hench J, Goedert M, Tolnay M (2015) Prion-like transmission and spreading of tau pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41:47-58.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nature cell biology* 11:909-913.
- Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ, Lee VM (2011) The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nature communications* 2:252.
- Colciaghi F, Borroni B, Pastorino L, Marcello E, Zimmermann M, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M (2002) [alpha]-Secretase ADAM10 as well as [alpha]APPs is reduced in platelets and CSF of Alzheimer disease patients. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 8:67-74.
- Coleman PD, Yao PJ (2003) Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:1023-1027.
- Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study G (1998) The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. *American Journal of Ophthalmology* 126:498-505.
- Cordeiro MF, Guo L, Luong V, Harding G, Wang W, Jones HE, Moss SE, Sillito AM, Fitzke FW (2004) Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:13352-13356.
- Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Yang F, Davies P, Yang AJ (2006) Alzheimer Disease-specific Conformation of Hyperphosphorylated Paired Helical Filament-Tau Is Polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 Ubiquitin Conjugation. *Journal of Biological Chemistry* 281:10825-10838.
- Crish SD, Calkins DJ (2011) Neurodegeneration in glaucoma: progression and calcium-dependent intracellular mechanisms. *Neuroscience* 176:1-11.

- Crish SD, Sappington RM, Inman DM, Horner PJ, Calkins DJ (2010) Distal axonopathy with structural persistence in glaucomatous neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:5196-5201.
- Cronin-Golomb A (1995) Vision in Alzheimer's disease. *The Gerontologist* 35:370-376.
- Cronin-Golomb A, Corkin S, Growdon JH (1995) Visual dysfunction predicts cognitive deficits in Alzheimer's disease. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 72:168-176.
- Cudic M, Fields GB (2009) Extracellular proteases as targets for drug development. *Current protein & peptide science* 10:297-307.
- Cueva Vargas JL, Belforte N, Di Polo A (2016) The glial cell modulator ibudilast attenuates neuroinflammation and enhances retinal ganglion cell viability in glaucoma through protein kinase A signaling. *Neurobiology of Disease* 93:156-171.
- Cueva Vargas JL, Osswald IK, Unsain N, Arousseau MR, Barker PA, Bowie D, Di Polo A (2015) Soluble tumor necrosis factor alpha promotes retinal ganglion cell death in glaucoma via calcium-permeable AMPA receptor activation. *J Neurosci* 35:12088-12102.
- Cui Q, Yip HK, Zhao RC, So KF, Harvey AR (2003) Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci* 22:49-61.
- Danesh-Meyer HV, Birch H, Ku JY, Carroll S, Gamble G (2006) Reduction of optic nerve fibers in patients with Alzheimer disease identified by laser imaging. *Neurology* 67:1852-1854.
- Dapper JD, Crish SD, Pang IH, Calkins DJ (2013) Proximal inhibition of p38 MAPK stress signaling prevents distal axonopathy. *Neurobiol Dis* 59:26-37.
- Davis DR, Anderton BH, Brion J-P, Reynolds CH, Hanger DP (1997) Oxidative stress induces dephosphorylation of  $\tau$  in rat brain primary neuronal cultures. *J Neurochem* 68:1590-1597.
- de A Moura AL, Raza AS, Lazow MA, De Moraes CG, Hood DC (2012) Retinal ganglion cell and inner plexiform layer thickness measurements in regions of severe visual field sensitivity loss in patients with glaucoma. *Eye* 26:1188-1193.

- de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL, Hyman BT (2012) Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 73:685-697.
- De Strooper B (2010) Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. *Physiological Reviews* 90:465-494.
- De Strooper B, Karran E (2016) The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164:603-615.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390.
- Dehmelt L, Halpain S (2004) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biology* 6:1-10.
- Delacourte A, Dufosse A (1986) Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *Journal of the Neurological Sciences* 76:173-186.
- Della Santina L, Inman DM, Lupien CB, Horner PJ, Wong ROL (2013) Differential Progression of Structural and Functional Alterations in Distinct Retinal Ganglion Cell Types in a Mouse Model of Glaucoma. *The Journal of Neuroscience* 33:17444-17457.
- Dickey CA, Kamal A, Lundgren K, Klosak N, Bailey RM, Dunmore J, Ash P, Shoraka S, Zlatkovic J, Eckman CB, Patterson C, Dickson DW, Nahman NS, Jr., Hutton M, Burrows F, Petrucelli L (2007) The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *The Journal of Clinical Investigation* 117:648-658.
- Ding H, Dolan PJ, Johnson GV (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 106:2119-2130.
- Di Polo A, Aigner LJ, Dunn RJ, Bray GM, Aguayo AJ (1998) Prolonged delivery of brain-derived neurotrophic factor by adenovirus-infected Muller cells temporarily rescues injured retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3978-3983.

- Dong DW, Zhang YS, Yang WY, Wang-Qin RQ, Xu AD, Ruan YW (2014) Hyperphosphorylation of tau protein in the ipsilateral thalamus after focal cortical infarction in rats. *Brain Res* 1543:280-289.
- Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:721-726.
- Doucette LP, Rasnitsyn A, Seifi M, Walter MA (2015) The interactions of genes, age, and environment in glaucoma pathogenesis. *Surv Ophthalmol* 60:310-326.
- Drewes G, Mandelkow EM, Baumann K, Goris J, Merlevede W, Mandelkow E (1993) Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A. *FEBS Lett* 336:425-432.
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark): A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *Journal of Biological Chemistry* 270:7679-7688.
- Drexler W, Morgner U, Ghanta RK, Kärtner FX, Schuman JS, Fujimoto JG (2001) Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography. *Nature medicine* 7:502-507.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739-2746.
- Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, Loyens A, Galas M-C, Bousset L, Melki R, Aurégan G, Hantraye P, Brouillet E, Buée L, Colin M (2014) Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein. *PLoS ONE* 9:e100760.
- Eckman EA, Watson M, Marlow L, Sambamurti K, Eckman CB (2003) Alzheimer's Disease  $\beta$ -Amyloid Peptide Is Increased in Mice Deficient in Endothelin-converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 278:2081-2084.
- Eckman EA, Adams SK, Troendle FJ, Stodola BA, Kahn MA, Fauq AH, Xiao HD, Bernstein KE, Eckman CB (2006) Regulation of Steady-state  $\beta$ -Amyloid Levels in the Brain by Neprilysin and

- Endothelin-converting Enzyme but Not Angiotensin-converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 281:30471-30478.
- El-Danaf RN, Huberman AD (2015) Characteristic Patterns of Dendritic Remodeling in Early-Stage Glaucoma: Evidence from Genetically Identified Retinal Ganglion Cell Types. *The Journal of Neuroscience* 35:2329-2343.
- Fá M et al. (2016) Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory. *Scientific Reports* 6:19393.
- Fahrenholz F, Gilbert S, Kojro E, Lammich S, Postina R (2000) Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10. Influences of domain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences* 920:215-222.
- Fahy ET, Chrysostomou V, Crowston JG (2015) Impaired axonal transport and glaucoma. *Curr Eye Res* 19:1-11.
- Farris W, Mansourian S, Leissring MA, Eckman EA, Bertram L, Eckman CB, Tanzi RE, Selkoe DJ (2004) Partial Loss-of-Function Mutations in Insulin-Degrading Enzyme that Induce Diabetes also Impair Degradation of Amyloid  $\beta$ -Protein. *The American journal of pathology* 164:1425-1434.
- Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A (2000) The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem* 75:624-633.
- Feany MB, Mattiace LA, Dickson DW (1996) Neuropathologic Overlap of Progressive Supranuclear Palsy, Pick's Disease and Corticobasal Degeneration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 55:53-67.
- Feinstein SC, Wilson L (2005) Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: a loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death. *Biochim Biophys Acta* 1739:268-279.

- Feng L, Zhao Y, Yoshida M, Chen H, Yang JF, Kim TS, Cang J, Troy JB, Liu X (2013) Sustained ocular hypertension induces dendritic degeneration of mouse retinal ganglion cells that depends on cell type and location. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:1106-1117.
- Fernández-Sánchez L, de Sevilla Müller LP, Brecha NC, Cuenca N (2014) Loss of outer retinal neurons and circuitry alterations in the DBA/2J mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:6059-6072.
- Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL, Kawas CH, Jagust W (2005) Survival following dementia onset: Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci* 229-230:43-49.
- Fontaine S, Sabbagh J, Baker J, Martinez-Licha C, Darling A, Dickey C (2015) Cellular factors modulating the mechanism of tau protein aggregation. *Cell Mol Life Sci* 72:1863-1879.
- Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ (2002) The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys. *The British journal of ophthalmology* 86:238-242.
- Frankfort BJ, Khan AK, Tse DY, Chung I, Pang J-J, Yang Z, Gross RL, Wu SM (2013) Elevated intraocular pressure causes inner retinal dysfunction before cell loss in a mouse model of experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol & Vis Sci* 54:762-770.
- Friedman DS, Wilson MR, Liebmann JM, Fechtner RD, Weinreb RN (2004) An evidence-based assessment of risk factors for the progression of ocular hypertension and glaucoma. *American Journal of Ophthalmology* 138:S19-S31.
- Fu CT, Sretavan D (2010) Laser-Induced Ocular Hypertension in Albino CD-1 Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51:980-990.
- Gaasterland D, Kupfer C (1974) Experimental glaucoma in the rhesus monkey. *Investigative Ophthalmology* 13:455-457.
- Gakhar-Koppole N, Hundeshagen P, Mandl C, Weyer SW, Allinquant B, Müller U, Ciccolini F (2008) Activity requires soluble amyloid precursor protein  $\alpha$  to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway. *European Journal of Neuroscience* 28:871-882.
- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (2003) Caspase cleavage of tau: linking



- amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10032-10037.
- Ganguli M, Dodge HH, Shen C, Pandav RS, DeKosky ST (2005) Alzheimer disease and mortality: a 15-year epidemiological study. *Arch Neurol* 62:779-784.
- Garcia-Alloza M, Dodwell SA, Meyer-Luehmann M, Hyman BT, Bacskai BJ (2006) Plaque-Derived Oxidative Stress Mediates Distorted Neurite Trajectories in the Alzheimer Mouse Model. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65:1082-1089.
- Garcia-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry RW, Binder LI (2003) Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 5:65-77.
- Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC (1995) Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Experimental eye research* 61:33-44.
- Garway-Heath DF, Caprioli J, Fitzke FW, Hitchings RA (2000) Scaling the hill of vision: the physiological relationship between light sensitivity and ganglion cell numbers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1774-1782.
- Garway-Heath DF, Holder GE, Fitzke FW, Hitchings RA (2002) Relationship between electrophysiological, psychophysical, and anatomical measurements in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2213-2220.
- Gasparini L, Crowther RA, Martin KR, Berg N, Coleman M, Goedert M, Spillantini MG (2011a) Tau inclusions in retinal ganglion cells of human P301S tau transgenic mice: effects on axonal viability. *Neurobiol Aging* 32:419-433.
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS (2011) Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation* 8:1-13.
- Gendreau KL, Hall GF (2013) Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol* 4:160.
- Genin E et al. (2011) APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Molecular psychiatry* 16:903-907.

- Gerlo S, Kooijman R, Beck IM, Kolmus K, Spooren A, Haegeman G (2011) Cyclic AMP: a selective modulator of NF- $\kappa$ B action. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:3823-3841.
- Gerson J, Sengupta U, Lasagna-Reeves C, Guerrero-Munoz M, Troncoso J, Kaye R (2014) Characterization of tau oligomeric seeds in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol Comm* 2:73.
- Gerson JE, Kaye R (2013) Formation and propagation of Tau oligomeric seeds. *Front Neurol* 4:93.
- Ghoshal N, García-Sierra F, Wu J, Leurgans S, Bennett D, Berry R, Binder L (2002) Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 177:475-493.
- Gilley J, Seereeram A, Ando K, Mosely S, Andrews S, Kerschensteiner M, Misgeld T, Brion J-P, Anderton B, Hanger DP, Coleman MP (2012) Age-dependent axonal transport and locomotor changes and tau hypophosphorylation in a "P301L" tau knockin mouse. *Neurobiology of Aging* 33:621.e621-621.e615.
- Giuditta A, Tai Chun J, Eyman M, Cefaliello C, Bruno AP, Crispino M (2008) Local Gene Expression in Axons and Nerve Endings: The Glia-Neuron Unit. *Physiological Reviews* 88:515-555.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.
- Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *The EMBO Journal* 9:4225-4230.
- Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA (1992) Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1983-1987.
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383:550-553.

- Goldblum D, Kipfer-Kauer A, Sarra G, Wolf S, Frueh B (2007) Distribution of amyloid precursor protein and amyloid-beta immunoreactivity in DBA/2J glaucomatous mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:5085-5090.
- Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon J, Petersen R, Parisi J, Hyman B (1997) Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41:17-24.
- Gong B, Radulovic M, Figueiredo-Pereira ME, Cardozo C (2016) THE UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM: POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS FOR ALZHEIMER'S DISEASE AND SPINAL CORD INJURY. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9.
- Gong C-X, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Phosphorylation of Microtubule-associated Protein Tau Is Regulated by Protein Phosphatase 2A in Mammalian Brain: IMPLICATIONS FOR NEUROFIBRILLARY DEGENERATION IN ALZHEIMER'S DISEASE. *Journal of Biological Chemistry* 275:5535-5544.
- Gotz J, Probst A, Spillantini MG, Schafer T, Jakes R, Burki K, Goedert M (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO Journal* 14:1304-1313.
- Greenberg SG, Davies P, Schein JD, Binder LI (1992) Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *Journal of Biological Chemistry* 267:564-569.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL, Araoz C (1989) Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:7611-7615.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:4913-4917.
- Gschwind M, Huber G (1995) Apoptotic cell death induced by  $\beta$ -amyloid1-42 peptide is cell type dependent. *Journal of Neurochemistry* 65:292-300.

- Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, Ferrari G, Russo-Marie F, Sillito AM, Cheetham ME, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF (2007) Targeting amyloid- $\beta$  in glaucoma treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:13444-13449.
- Guo Y, Johnson E, Cepurna W, Jia L, Dyck J, Morrison JC (2009) Does elevated intraocular pressure reduce retinal TRKB-mediated survival signaling in experimental glaucoma? *Experimental eye research* 89:921-933.
- Guo Y, Johnson EC, Cepurna WO, Dyck JA, Doser T, Morrison JC (2011) Early gene expression changes in the retinal ganglion cell layer of a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:1460-1473.
- Gupta N, Fong J, Ang LC, Yucel YH (2008) Retinal tau pathology in human glaucomas. *Canadian journal of ophthalmology Journal canadien d'ophtalmologie* 43:53-60.
- Gupta VK, Chitranshi N, Gupta VB, Golzan M, Dheer Y, Wall RV, Georgevsky D, King AE, Vickers JC, Chung R, Graham S (2016) Amyloid beta accumulation and inner retinal degenerative changes in Alzheimer's disease transgenic mouse. *Neuroscience letters* 623:52-56.
- Guthrie CR, Kraemer BC (2011) Proteasome inhibition drives HDAC6-dependent recruitment of tau to aggresomes. *Journal of molecular neuroscience* : MN 45:32-41.
- Guzman-Martinez L, Farias GA, Maccioni RB (2013) TAU OLIGOMERS AS DIRECT TARGETS FOR ALZHEIMER'S DIAGNOSIS AND NOVEL DRUGS. *Frontiers in Neurology* 4.
- Hall AM, Roberson ED (2012) Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* 88:3-12.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-[beta]. *Nat Immunol* 9:857-865.
- Hamano T, Gendron TF, Causevic E, Yen S-H, Lin W-L, Isidoro C, DeTure M, Ko L-w (2008) Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *European Journal of Neuroscience* 27:1119-1130.

- Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Molecular Med* 15:112-119.
- Harada T, Harada C, Nakamura K, Quah HM, Okumura A, Namekata K, Saeki T, Aihara M, Yoshida H, Mitani A, Tanaka K (2007) The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma. *J Clin Invest* 117:1763-1770.
- Harazny J, Scholz M, Buder T, Lausen B, Kremers J (2009) Electrophysiological deficits in the retina of the DBA/2J mouse. *Documenta Ophthalmologica* 119:181-197.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hardy J, Duff K, Hardy KG, Perez-Tur J, Hutton M (1998) Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat Neurosci* 1:355-358.
- Harwerth RS, Carter-Dawson L, Shen F, Smith EL, 3rd, Crawford ML (1999) Ganglion cell losses underlying visual field defects from experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2242-2250.
- Hecimovic S, Wang J, Dolios G, Martinez M, Wang R, Goate AM (2004) Mutations in APP have independent effects on A $\beta$  and CTF $\gamma$  generation. *Neurobiol Dis* 17:205-218.
- Hedstrom KL, Ogawa Y, Rasband MN (2008) AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol* 183:635-640.
- Heijl A, Leske M, Bengtsson B, et al. (2002) Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: Results from the early manifest glaucoma trial. *Archives of Ophthalmology* 120:1268-1279.
- Helmer C, Malet F, Rougier MB, Schweitzer C, Colin J, Delyfer MN, Korobelnik JF, Barberger-Gateau P, Dartigues JF, Delcourt C (2013) Is there a link between open-angle glaucoma and dementia? The Three-City-Alienor cohort. *Annals of neurology* 74:171-179.
- Helzner EP, Scarmeas N, Cosentino S, Tang MX, Schupf N, Stern Y (2008) Survival in Alzheimer disease: a multiethnic, population-based study of incident cases. *Neurology* 71:1489-1495.

- Herrup K (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci*:794-799.
- Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, Danner S, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Burki K, van Duinen SG, Maat-Schieman ML, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M (2004) Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nature neuroscience* 7:954-960.
- Himmelstein DS, Ward SM, Lancia JK, Patterson KR, Binder LI (2012) Tau as a therapeutic target in neurodegenerative disease. *Pharmacol Ther* 136:8-22.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9:1381-1388.
- Hinton DR, Sadun AA, Blanks JC, Miller CA (1986) Optic-Nerve Degeneration in Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 315:485-487.
- Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y (1996) Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol* 132:667-679.
- Ho WL, Leung Y, Cheng SSY, Lok CKM, Ho Y-S, Baum L, Yang X, Chiu K, Chang RC-C (2015) Investigating degeneration of the retina in young and aged tau P301L mice. *Life Sciences* 124:16-23.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *The EMBO Journal* 9:2459-2464.
- Hollows FC, Graham PA (1966) Intra-ocular pressure, glaucoma, and glaucoma suspects in a defined population. *The British journal of ophthalmology* 50:570-586.
- Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (2002) Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 51:783-786.
- Hong HS, Hwang EM, Sim HJ, Cho HJ, Boo JH, Oh SS, Kim SU, Mook-Jung I (2003) Interferon  $\gamma$  stimulates  $\beta$ -secretase expression and sAPP $\beta$  production in astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307:922-927.

- Hood DC, Kardon RH (2007) A framework for comparing structural and functional measures of glaucomatous damage. *Progress in Retinal and Eye Research* 26:688-710.
- Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI (2004) Early N-Terminal Changes and Caspase-6 Cleavage of Tau in Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 24:7895.
- Howell GR, Soto I, Libby RT, John SW (2013) Intrinsic axonal degeneration pathways are critical for glaucomatous damage. *Experimental neurology* 246:54-61.
- Howell GR, Libby RT, Jakobs TC, Smith RS, Phalan FC, Barter JW, Barbay JM, Marchant JK, Mahesh N, Porciatti V, Whitmore AV, Masland RH, John SWM (2007) Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *Journal of Cell Biology* 179:1523-1537.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (New York, NY)* 274:99-102.
- Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, Malinow R (2006) AMPAR Removal Underlies A $\beta$ -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron* 52:831-843.
- Huang EJ, Reichardt LF (2001) Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736.
- Huang W, Dobberfuhr A, Filippopoulos T, Ingelsson M, Fileta JB, Poulin NR, Grosskreutz CL (2005a) Transcriptional up-regulation and activation of initiating caspases in experimental glaucoma. *American Journal of Pathology* 167:673-681.
- Huang W, Fileta JB, Dobberfuhr A, Filippopoulos T, Guo Y, Kwon G, Grosskreutz CL (2005b) Calcineurin cleavage is triggered by elevated intraocular pressure, and calcineurin inhibition blocks retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:12242-12247.

- Hung AY, Koo EH, Haass C, Selkoe DJ (1992) Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9439-9443.
- Husain S, Abdul Y, Crosson CE (2012) Preservation of retina ganglion cell function by morphine in a chronic ocular-hypertensive rat model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:4289-4298.
- Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: Their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40:195-205.
- Hyttinen JM, Amadio M, Viiri J, Pascale A, Salminen A, Kaarniranta K (2014) Clearance of misfolded and aggregated proteins by autophagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Res Rev* 18:16-28.
- Iqbal K, Zaidi T, Bancher C, Grundke-Iqbal I (1994) Alzheimer paired helical filaments Restoration of the biological activity by dephosphorylation. *FEBS Letters* 349:104-108.
- Iqbal K, del C. Alonso A, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong C-X, Khatoon S, Li B, Liu F, Rahman A, Tanimukai H, Grundke-Iqbal I (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1739:198-210.
- Ishida K, Yamamoto T, Sugiyama K, Kitazawa Y (2000) Disk hemorrhage is a significantly negative prognostic factor in normal-tension glaucoma. *Am J Ophthalmol* 129:707-714.
- Ito Y, Shimazawa M, Tsuruma K, Mayama C, Ishii K, Onoe H, Aihara M, Araie M, Hara H (2012) Induction of amyloid- $\beta$ (1-42) in the retina and optic nerve head of chronic ocular hypertensive monkeys. *Mol Vis* 18:2647-2657.
- Ito YA, Belforte N, Cueva Vargas JL, Di Polo A (2016) A Magnetic Microbead Occlusion Model to Induce Ocular Hypertension-Dependent Glaucoma in Mice. e53731.
- Ittner LM, Gotz J (2011) Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:65-72.



- Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (2010) Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- $\beta$  Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell* 142:387-397.
- Ivins KJ, Thornton PL, Rohn TT, Cotman CW (1999) Neuronal Apoptosis Induced by  $\beta$ -Amyloid Is Mediated by Caspase-8. *Neurobiology of Disease* 6:440-449.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292:1550-1552.
- Jackson GR, Owsley C (2003) Visual dysfunction, neurodegenerative diseases, and aging. *Neurol Clin* 21:709-728.
- James BD, Leurgans SE, Hebert LE, Scherr PA, Yaffe K, Bennett DA (2014) Contribution of Alzheimer disease to mortality in the United States. *Neurology* 82:1045-1050.
- Jang SS, Chung HJ (2016) Emerging Link between Alzheimer's Disease and Homeostatic Synaptic Plasticity. *Neural plasticity* 2016:7969272.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomolecular engineering* 17:157-165.
- Javaid FZ, Brenton J, Guo L, Cordeiro MF (2016) Visual and Ocular Manifestations of Alzheimer's Disease and Their Use as Biomarkers for Diagnosis and Progression. *Front Neurol* 7:55.
- Jay JL, Murdoch JR (1993) The rate of visual field loss in untreated primary open angle glaucoma. *The British journal of ophthalmology* 77:176-178.
- Jeganathan S, von Bergen M, Brutlach H, Steinhoff H-J, Mandelkow E (2006) Global Hairpin Folding of Tau in Solution. *Biochemistry* 45:2283-2293.
- Jenkins SM, Bennett V (2001) Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *The Journal of Cell Biology* 155:739-746.

- Jia L, Cepurna WO, Barber SL, Morrison JC, Johnson EC (2004) Retinal Neurotrophin And Trk Receptor mRNA Expression Following Elevated Intraocular Pressure Or Optic Nerve Transection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45:2163-2163.
- Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P (1997) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 48:128-132.
- Johnson EC, Jia L, Cepurna WO, Doser TA, Morrison JC (2007) Global changes in optic nerve head gene expression after exposure to elevated intraocular pressure in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:3161-3177.
- Johnson KA, Fox NC, Sperling RA, Klunk WE (2012) Brain imaging in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006213.
- Kaiser HJ, Flammer J, Wenk M, Luscher T (1995) Endothelin-1 plasma levels in normal-tension glaucoma: abnormal response to postural changes. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 233:484-488.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937.
- Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:579-592.
- Kanaan NM, Morfini G, Pigino G, LaPointe NE, Andreadis A, Song Y, Leitman E, Binder LI, Brady ST (2012) Phosphorylation in the amino terminus of tau prevents inhibition of anterograde axonal transport. *Neurobiol Aging* 33:826.e815-830.
- Kanai Y, Hirokawa N (1995) Sorting mechanisms of Tau and MAP2 in neurons: Suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding. *Neuron* 14:421-432.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 10:381-391.

- Karran E, De Strooper B (2016) The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry*:n/a-n/a.
- Kass MA, Heuer DK, Higginbotham EJ, Johnson CA, Keltner JL, Miller JP, Parrish RK, 2nd, Wilson MR, Gordon MO (2002) The Ocular Hypertension Treatment Study: a randomized trial determines that topical ocular hypotensive medication delays or prevents the onset of primary open-angle glaucoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 120:701-713; discussion 829-730.
- Katz B, Rimmer S (1989) Ophthalmologic manifestations of Alzheimer's disease. *Surv Ophthalmol* 34:31-43.
- Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115:727-738.
- Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 85:115-122.
- Kedzierski RM, Yanagisawa M (2001) Endothelin system: The double-edged sword in health and disease. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, pp 851-876.
- Keller KE, Acott TS (2013) The Juxtacanalicular Region of Ocular Trabecular Meshwork: A Tissue with a Unique Extracellular Matrix and Specialized Function. *Journal of ocular biology* 1:3.
- Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME (1997) TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Archives of Ophthalmology* 115:1031-1035.
- Kesler A, Vakhapova V, Korczyn AD, Naftaliev E, Neudorfer M (2011) Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clinical neurology and neurosurgery* 113:523-526.
- Kim HS, Park CK (2005) Retinal ganglion cell death is delayed by activation of retinal intrinsic cell survival program. *Brain Research* 1057:17-28.

- Kim YK, Suarez J, Hu Y, McDonough PM, Boer C, Dix DJ, Dillmann WH (2006) Deletion of the inducible 70-kDa heat shock protein genes in mice impairs cardiac contractile function and calcium handling associated with hypertrophy. *Circulation* 113:2589-2597.
- Kimura T, Yamashita S, Fukuda T, Park JM, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Sahara N, Takashima A (2007) Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. *EMBO Journal* 26:5143-5152.
- Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, YasuoIham, Miyamoto E, Miyakawa T (1996) Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* 7:177-181.
- Kipfer-Kauer A, McKinnon SJ, Frueh BE, Goldblum D (2010) Distribution of amyloid precursor protein and amyloid- $\beta$  in ocular hypertensive C57BL/6 mouse eyes. *Curr Eye Res* 35:828-834.
- Kittelberger KA, Piazza F, Tesco G, Reijmers LG (2012) Natural amyloid-beta oligomers acutely impair the formation of a contextual fear memory in mice. *PLoS One* 7:e29940.
- Klein BE, Klein R, Sponsel WE, Franke T, Cantor LB, Martone J, Menage MJ (1992) Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 99:1499-1504.
- Klunk WE et al. (2004) Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Annals of neurology* 55:306-319.
- Knobloch M, Konietzko U, Krebs DC, Nitsch RM (2007) Intracellular Abeta and cognitive deficits precede beta-amyloid deposition in transgenic arcAbeta mice. *Neurobiology of aging* 28:1297-1306.
- Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC (2000) The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 41:2967-2971.
- Ko ML, Hu DN, Ritch R, Sharma SC, Chen CF (2001) Patterns of retinal ganglion cell survival after brain-derived neurotrophic factor administration in hypertensive eyes of rats. *Neuroscience letters* 305:139-142.

- Konzack S, Thies E, Marx A, Mandelkow EM, Mandelkow E (2007) Swimming against the tide: mobility of the microtubule-associated protein tau in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:9916-9927.
- Koronyo-Hamaoui M, Koronyo Y, Ljubimov AV, Miller CA, Ko MK, Black KL, Schwartz M, Farkas DL (2011) Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive *in vivo* optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *Neuroimage* 54 Suppl 1:S204-217.
- Kosik K, Finch E (1987) MAP2 and tau segregate into dendritic and axonal domains after the elaboration of morphologically distinct neurites: an immunocytochemical study of cultured rat cerebrum. *J Neurosci* 7:3142-3153.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.
- Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ, Schellenberg GD (2003) Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9980-9985.
- Kuret J, Chirita CN, Congdon EE, Kannanayakal T, Li G, Necula M, Yin H, Zhong Q (2005) Pathways of tau fibrillization. *Biochim Biophys Acta* 1739:167-178.
- Kuszczyk M, Gordon-Krajcer W, Lazarewicz JW (2009) Homocysteine-induced acute excitotoxicity in cerebellar granule cells *in vitro* is accompanied by PP2A-mediated dephosphorylation of tau. *Neurochem Int* 55:174-180.
- Lacroix B, van Dijk J, Gold ND, Guizetti J, Aldrian-Herrada G, Rogowski K, Gerlich DW, Janke C (2010) Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* 189:945-954.
- Lam YA, Pickart CM, Alban A, Landon M, Jamieson C, Ramage R, Mayer RJ, Layfield R (2000) Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:9902-9906.
- Lander GC, Estrin E, Matyskiela ME, Bashore C, Nogales E, Martin A (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* 482:186-191.

- Larson EB, Shadlen MF, Wang L, McCormick WC, Bowen JD, Teri L, Kukull WA (2004) Survival after initial diagnosis of Alzheimer disease. *Annals of internal medicine* 140:501-509.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Muñoz MJ, Jackson GR, Kaye R (2010) Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry* 49:10039-10041.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kaye R (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Molecular neurodegeneration* 6:39.
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, Kaye R (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J* 26:1946-1959.
- Lau J, Dang M, Hockmann K, Ball AK (2006) Effects of acute delivery of endothelin-1 on retinal ganglion cell loss in the rat. *Experimental eye research* 82:132-145.
- Lebrun-Julien F, Di Polo A (2008) Molecular and cell-based approaches for neuroprotection in glaucoma. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 85:417-424.
- Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, Osswald I, Sapienza P, Bourgeois P, Dickson K, Bowie D, Barker PA, Di Polo A (2009) Excitotoxic death of retinal neurons *in vivo* occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *Journal of Neuroscience* 29:5536-5545.
- Lebrun-Julien F, Bertrand MJ, De Backer O, Stellwagen D, Morales CR, Di Polo A, Barker PA (2010) ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3817-3822.
- Lee AG, Martin CO (2004) Neuro-ophthalmic findings in the visual variant of Alzheimer's disease. *Ophthalmology* 111:376-380.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 ( Pt 21):3167-3177.
- Lee G, Leugers CJ (2012) Tau and tauopathies. *Prog Mol Biol Transl Sci* 107:263-293.

- Lee MJ, Lee JH, Rubinsztein DC (2013) Tau degradation: the ubiquitin-proteasome system versus the autophagy-lysosome system. *Prog Neurobiol* 105:49-59.
- Lee S, Sheck L, Crowston JG, Van Bergen NJ, O'Neill EC, O'Hare F, Kong YXG, Chrysostomou V, Vincent AL, Troncone IA (2012) Impaired Complex-I-Linked Respiration and ATP Synthesis in Primary Open-Angle Glaucoma Patient Lymphoblasts Impaired Complex-I in POAG Lymphoblast. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:2431-2437.
- Leger F, Fernagut P, Canron M, Léoni S, Vital C, Tison F, Bezard E, Vital A (2011) Protein aggregation in the aging retina. *J Neuropathol Exp Neurol* 70:63-68.
- Leibowitz HM, Krueger DE, Maunder LR, Milton RC, Kini MM, Kahn HA, Nickerson RJ, Pool J, Colton TL, Ganley JP, Loewenstein JJ, Dawber TR (1980) The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Survey of ophthalmology* 24:335-610.
- Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40:1087-1093.
- Leon S, Yin Y, Nguyen J, Irwin N, Benowitz LI (2000) Lens injury stimulates axon regeneration in the mature rat optic nerve. *J Neurosci* 20:4615-4626.
- Leske MC (1983) The epidemiology of open-angle glaucoma: a review. *American journal of epidemiology* 118:166-191.
- Leske MC, Connell AM, Wu SY, Hyman LG, Schachat AP (1995) Risk factors for open-angle glaucoma. The Barbados Eye Study. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 113:918-924.
- Leske MC, Heijl A, Hussein M, Bengtsson B, Hyman L, Komaroff E (2003) Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch Ophthalmol* 121:48 - 56.

- Lesne S, Ali C, Gabriel C, Croci N, MacKenzie ET, Glabe CG, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C, Vivien D, Buisson A (2005) NMDA receptor activation inhibits alpha-secretase and promotes neuronal amyloid-beta production. *J Neurosci* 25:9367-9377.
- Leterrier C, Dargent B (2014) No Pasaran! Role of the axon initial segment in the regulation of protein transport and the maintenance of axonal identity. *Semin Cell Dev Biol* 27:44-51.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KRG, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME (2002) Translimbal Laser Photocoagulation to the Trabecular Meshwork as a Model of Glaucoma in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43:402-410.
- Levy SF, LeBoeuf AC, Massie MR, Jordan MA, Wilson L, Feinstein SC (2005) Three- and four-repeat tau regulate the dynamic instability of two distinct microtubule subpopulations in qualitatively different manners: Implications for neurodegeneration. *J Biol Chem* 280:13520-13528.
- Li H-L, Wang H-H, Liu S-J, Deng Y-Q, Zhang Y-J, Tian Q, Wang X-C, Chen X-Q, Yang Y, Zhang J-Y, Wang Q, Xu H, Liao F-F, Wang J-Z (2007) Phosphorylation of tau antagonizes apoptosis by stabilizing  $\beta$ -catenin, a mechanism involved in Alzheimer's neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:3591-3596.
- Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E (2011) Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *EMBO Journal* 30:4825-4837.
- Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SKF (1996)  $\beta$ -Amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Research* 738:196-204.
- Libby RT, Li Y, Savinova OV, Barter J, Smith RS, Nickells RW, John SW (2005a) Susceptibility to neurodegeneration in a glaucoma is modified by Bax gene dosage. *PLoS genetics* 1:17-26.
- Libby RT, Anderson MG, Pang IH, Robinson ZH, Savinova OV, Cosma IM, Snow A, Wilson LA, Smith RS, Clark AF, John SW (2005b) Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci* 22:637-648.



- Lichter PR, Musch DC, Gillespie BW, Guire KE, Janz NK, Wren PA, Mills RP (2001) Interim clinical outcomes in the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study comparing initial treatment randomized to medications or surgery. *Ophthalmology* 108:1943-1953.
- Lim J, Yue Z (2015) Neuronal aggregates: formation, clearance, and spreading. *Dev Cell* 32:491-501.
- Lin IC, Wang Y-H, Wang T-J, Wang IJ, Shen Y-D, Chi N-F, Chien L-N (2014) Glaucoma, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: An 8-Year Population-Based Follow-Up Study. *PLoS ONE* 9:e108938.
- Lindsey JD, Duong-Polk KX, Hammond D, Leung CK-s, Weinreb RN (2015) Protection of injured retinal ganglion cell dendrites and unfolded protein response resolution after long-term dietary resveratrol. *Neurobiology of Aging* 36:1969-1981.
- Liu B, Rasool S, Yang Z, Glabe CG, Schreiber SS, Ge J, Tan Z (2009) Amyloid-peptide vaccinations reduce (Kuret et al.)-amyloid plaques but exacerbate vascular deposition and inflammation in the retina of Alzheimer's transgenic mice. *The American journal of pathology* 175:2099-2110.
- Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, Duff K (2012) Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology *In vivo*. *PLoS ONE* 7:e31302.
- Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, Auberson YP, Wang YT (2004) Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304:1021-1024.
- Liu M, Duggan J, Salt TE, Cordeiro MF (2011) Dendritic changes in visual pathways in glaucoma and other neurodegenerative conditions. *Experimental eye research* 92:244-250.
- Liu M, Guo L, Salt TE, Cordeiro MF (2014) Dendritic Changes in Rat Visual Pathway Associated with Experimental Ocular Hypertension. *Current Eye Research* 39:953-963.
- Liu XA, Liao K, Liu R, Wang HH, Zhang Y, Zhang Q, Wang Q, Li HL, Tian Q, Wang JZ (2010) Tau dephosphorylation potentiates apoptosis by mechanisms involving a failed dephosphorylation/activation of Bcl-2. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19:953-962.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2013) *Molecular Cell Biology*, 7th edition. W H Freeman and Company.

- London A, Benhar I, Schwartz M (2013) The retina as a window to the brain-from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol* 9:44-53.
- Lu M, Kosik KS (2001) Competition for Microtubule-binding with Dual Expression of Tau Missense and Splice Isoforms. *Molecular Biology of the Cell* 12:171-184.
- Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE, Frost DO (1998) BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J Neurosci* 18:2097-2107.
- Maas C, Schiks B, Strangi RD, Hackeng TM, Bouma BN, Gebbink MFBG, Bouma B (2008) Identification of fibronectin type I domains as amyloid-binding modules on tissue-type plasminogen activator and three homologs. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 15:166-180.
- Mac Nair CE, Fernandes KA, Schlamp CL, Libby RT, Nickells RW (2014) Tumor necrosis factor alpha has an early protective effect on retinal ganglion cells after optic nerve crush. *Journal of Neuroinflammation* 11:1-14.
- Maccioni RB, Otth C, Concha, II, Munoz JP (2001) The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem* 268:1518-1527.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2006) Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 54:197-201.
- Magnani E, Fan J, Gasparini L, Golding M, Williams M, Schiavo G, Goedert M, Amos LA, Spillantini MG (2007) Interaction of tau protein with the dynactin complex. *Embo j* 26:4546-4554.
- Mailliot C, Sergeant N, Bussi re T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Bu e L (1998) Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Letters* 433:201-204.
- Mailliot C, Podevin-Dimster V, Rosenthal R, Sergeant N, Delacourte A, Fiskum G, Bu e L (2000) Rapid tau protein dephosphorylation and differential rephosphorylation during cardiac arrest-induced cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:543-549.

- Mandelkow E-M, Thies E, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow E (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *The Journal of Cell Biology* 167:99-110.
- Mansour-Robaey S, Clarke DB, Wang Y-C, Bray GM, Aguayo AJ (1994) Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1632-1636.
- Mark RJ, Lovell MA, Markesbery WR, Uchida K, Mattson MP (1997) A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid  $\beta$ -Peptide. *Journal of Neurochemistry* 68:255-264.
- Marr RA, Rockenstein E, Mukherjee A, Kindy MS, Hersh LB, Gage FH, Verma IM, Masliah E (2003) Nephrilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J Neurosci* 23:1992-1996.
- Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW (2003) Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4357-4365.
- Masters SL, O'Neill LAJ (2011) Disease-associated amyloid and misfolded protein aggregates activate the inflammasome. *Trends in Molecular Medicine* 17:276-282.
- Mawal-Dewan M, Henley J, Van de Voorde A, Trojanowski JQ, Lee VM (1994) The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem* 269:30981-30987.
- Mazzaro N, Barini E, Spillantini MG, Goedert M, Medini P, Gasparini L (2016) Tau-Driven Neuronal and Neurotrophic Dysfunction in a Mouse Model of Early Tauopathy. *J Neurosci* 36:2086-2100.
- McDonough H, Patterson C (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress & Chaperones* 8:303-308.
- McKee AC et al. (2013) The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. *Brain* 136:43-64.
- McKinnon SJ, Lehman DM, Kerrigan-Baumrind LA, Merges CA, Pease ME, Kerrigan DF, Ransom NL, Tahzib NG, Reitsamer HA, Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Zack DJ (2002) Caspase

- activation and amyloid precursor protein cleavage in rat ocular hypertension. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 43:1077-1087.
- McLellan ME, Kajdasz ST, Hyman BT, Bacskai BJ (2003) *In vivo* imaging of reactive oxygen species specifically associated with thioflavine S-positive amyloid plaques by multiphoton microscopy. *J Neurosci* 23:2212-2217.
- Mendola JD, Cronin-Golomb A, Corkin S, Growdon JH (1995) Prevalence of visual deficits in Alzheimer's disease. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry* 72:155-167.
- Menkes-Caspi N, Yamin Hagar G, Kellner V, Spires-Jones Tara L, Cohen D, Stern Edward A (2015) Pathological Tau Disrupts Ongoing Network Activity. *Neuron* 85:959-966.
- Meraz Rios Ma, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernández J, Campos-Peña V (2013) Inflammatory Process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 7.
- Mercken M, Fischer I, Kosik K, Nixon R (1995) Three distinct axonal transport rates for tau, tubulin, and other microtubule-associated proteins: evidence for dynamic interactions of tau with microtubules *in vivo*. *The Journal of Neuroscience* 15:8259-8267.
- Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret JM, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M (2006) Exogenous induction of cerebral  $\beta$ -amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683-12688.
- Migheli A, Butler M, Brown K, Shelanski M (1988) Light and electron microscope localization of the microtubule-associated tau protein in rat brain. *J Neurosci* 8:1846-1851.
- Miller-Thomas MM, Sipe AL, Benzinger TLS, McConathy J, Connolly S, Schwetye KE (2016) Multimodality Review of Amyloid-related Diseases of the Central Nervous System. *RadioGraphics* 36:1147-1163.

- Min S-W, Cho S-H, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M, Gan L (2010) Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to Tauopathy. *Neuron* 67:953-966.
- Minkeviciene R, Rheims S, Dobszay MB, Zilberter M, Hartikainen J, Fülöp L, Penke B, Zilberter Y, Harkany T, Pitkänen A, Tanila H (2009) Amyloid  $\beta$ -Induced Neuronal Hyperexcitability Triggers Progressive Epilepsy. *The Journal of Neuroscience* 29:3453-3462.
- Miyata Y, Hoshi M, Nishida E, Minami Y, Sakai H (1986) Binding of microtubule-associated protein 2 and tau to the intermediate filament reassembled from neurofilament 70-kDa subunit protein. Its regulation by calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 261:13026-13030.
- Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V, Naidu A, Tesseur I, Spittaels K, Haute CV, Checler F, Godaux E, Cordell B, Van Leuven F (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *The Journal of biological chemistry* 274:6483-6492.
- Mohamed N-V, Plouffe V, Rémillard-Labrosse G, Planel E, Leclerc N (2014) Starvation and inhibition of lysosomal function increased tau secretion by primary cortical neurons. *Sci Rep* 4:5715.
- Mondragon-Rodriguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J (2012) Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem* 287.
- Mondragón-Rodríguez S, Basurto-Islas G, Santa-Maria I, Mena R, Binder LI, Avila J, Smith MA, Perry G, García-Sierra F (2008) Cleavage and conformational changes of tau protein follow phosphorylation during Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology* 89:81-90.
- Moon J-I, Kim I-B, Gwon J-S, Park M-H, Kang T-H, Lim E-J, Choi K-R, Chun M-H (2005) Changes in retinal neuronal populations in the DBA/2J mouse. *Cell and Tissue Research* 320:51-59.
- Morales R, Duran-Aniotz C, Castilla J, Estrada LD, Soto C (2012) De novo induction of amyloid-[beta] deposition *in vivo*. *Molecular psychiatry* 17:1347-1353.

- Morawe T, Hiebel C, Kern A, Behl C (2012) Protein homeostasis, aging and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 46:41-54.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1993) Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10:1151-1160.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Watanabe A, Titani K, Ihara Y (1995) Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* 16:365-371; discussion 371-380.
- Morquette B, Morquette P, Agostinone J, Feinstein E, McKinney RA, Kolta A, Di Polo A (2015) REDD2-mediated inhibition of mTOR promotes dendrite retraction induced by axonal injury. *Cell Death Differ* 22:612-625.
- Morquette JB, Di Polo A (2008) Dendritic and synaptic protection: is it enough to save the retinal ganglion cell body and axon? *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 28:144-154.
- Morrison JC, Cepurna WO, Johnson EC (2015) Modeling glaucoma in rats by sclerosing aqueous outflow pathways to elevate intraocular pressure. *Exp Eye Res* 141:23-32.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LMH, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC (1997) A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Experimental eye research* 64:85-96.
- Morsch R, Simon W, Coleman PD (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 58:188-197.
- Mouton PR (2002) *Principles and Practices of Unbiased Stereology: An Introduction for Bioscientists*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland (2002).
- Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, Wang X, Yu G, Esposito L, Mucke L, Gan L (2006) Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 51:703-714.
- Mukrasch MD, von Bergen M, Biernat J, Fischer D, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2007) The "Jaws" of the Tau-microtubule interaction. *Journal of Biological Chemistry* 282:12230-12239.

- Muller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 85:393-406.
- Myeku N, Clelland CL, Emrani S, Kukushkin NV, Yu WH, Goldberg AL, Duff KE (2016) Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling. *Nature medicine* 22:46-53.
- Nadal-Nicolas F, Jimenez-Lopez M, Sobrado Calvo P, Nieto-Lopez L, Canovas-Martinez I, Salinas Navarro M, Vidal Sanz M, Agudo M (2009) Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3860-3868.
- Nakazawa T, Nakazawa C, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Michaud N, Hafezi-Moghadam A, Miller JW, Benowitz LI (2006) Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Mediates Oligodendrocyte Death and Delayed Retinal Ganglion Cell Loss in a Mouse Model of Glaucoma. *The Journal of Neuroscience* 26:12633-12641.
- Narita M, Holtzman DM, Schwartz AL, Bu G (1997)  $\alpha$ 2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of  $\beta$ - amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *Journal of Neurochemistry* 69:1904-1911.
- Nasreddine ZS, Phillips NA, Bedirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, Cummings JL, Chertkow H (2005) The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *Journal of the American Geriatrics Society* 53:695-699.
- Nelson D, Cox M, Freeman WH (2004) Lehninger, Principles of Biochemistry (4th Ed.). Palgrave Macmillan.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TVP (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9:65-75.
- Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SWM (2012) Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Ann Rev Neurosci* 35:153-179.

- Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J (2008) Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Investigative ophthalmology & visual science* 49:5136-5143.
- Noble W, Hanger D, Gallo J (2010) Transgenic mouse models of tauopathy in drug discovery. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:403-428.
- Noble W, Planel E, Zehr C, Olm V, Meyerson J, Suleman F, Gaynor K, Wang L, LaFrancois J, Feinstein B, Burns M, Krishnamurthy P, Wen Y, Bhat R, Lewis J, Dickson D, Duff K (2005) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:6990-6995.
- Noebels JL (2011) A Perfect Storm: Converging Paths of Epilepsy and Alzheimer's Dementia Intersect in the Hippocampal Formation. *Epilepsia* 52:39-46.
- Nolin WB, Emmetsberger J, Bukhari N, Zhang Y, Levine JM, Tsirka SE (2008) tPA-mediated generation of plasmin is catalyzed by the proteoglycan NG2. *Glia* 56:177-189.
- Norton S, Matthews FE, Barnes DE, Yaffe K, Brayne C (2014) Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data. *The Lancet Neurology* 13:788-794.
- Nucci C, Martucci A, Martorana A, Sancesario GM, Cerulli L (2011) Glaucoma progression associated with altered cerebral spinal fluid levels of amyloid beta and tau proteins. *Clin Experiment Ophthalmol* 39:279-281.
- Oblinger M, Argasinski A, Wong J, Kosik K (1991) Tau gene expression in rat sensory neurons during development and regeneration. *J Neurosci* 11:2453-2459.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003a) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24:1063-1070.
- Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM (2004) A $\beta$  Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome. *Neuron* 43:321-332.



- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003b) Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 39:409-421.
- Olzmann JA, Kopito RR, Christianson JC (2013) The Mammalian Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5.
- Ortín-Martínez A, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Bernal-Garro JM, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M (2015) Laser-induced ocular hypertension in adult rats does not affect non-RGC neurons in the ganglion cell layer but results in protracted severe loss of cone-photoreceptors. *Exp Eye Res* 132:17-33.
- Otvos L, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VMY (1994) Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *Journal of Neuroscience Research* 39:669-673.
- Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu G-Q, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L (2007) Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Neuron* 55:697-711.
- Pang IH, Clark AF (2007) Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *Journal of glaucoma* 16:483-505.
- Pang J-J, Frankfort BJ, Gross RL, Wu SM (2015) Elevated intraocular pressure decreases response sensitivity of inner retinal neurons in experimental glaucoma mice. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Paquet C, Boissonnot M, Roger F, Dighiero P, Gil R, Hugon J (2007) Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters* 420:97-99.
- Parisi V, Restuccia R, Fattapposta F, Mina C, Bucci MG, Pierelli F (2001) Morphological and functional retinal impairment in Alzheimer's disease patients. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 112:1860-1867.

- Park HY, Kim JH, Park CK (2014) Alterations of the synapse of the inner retinal layers after chronic intraocular pressure elevation in glaucoma animal model. *Molecular brain* 7:53.
- Patterson C, Höhfeld J (2008) Molecular Chaperones and the Ubiquitin–Proteasome System. In: *Protein Science Encyclopedia*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Patterson D, Gardiner K, Kao FT, Tanzi R, Watkins P, Gusella JF (1988) Mapping of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein and its relationship to the Down syndrome region of chromosome 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:8266-8270.
- Patterson KR, Ward SM, Combs B, Voss K, Kanaan NM, Morfini G, Brady ST, Gamblin TC, Binder LI (2011) Heat Shock Protein 70 Prevents both Tau Aggregation and the Inhibitory Effects of Preexisting Tau Aggregates on Fast Axonal Transport. *Biochemistry* 50:10300-10310.
- Pavlidis M, Stupp T, Naskar R, Cengiz C, Thanos S (2003) Retinal Ganglion Cells Resistant to Advanced Glaucoma: A Postmortem Study of Human Retinas with the Carbocyanine Dye DiI. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44:5196-5205.
- Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ (2000) Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:764-774.
- Perez M, Santa-Maria I, De Barreda EG, Zhu X, Cuadros R, Cabrero JR, Sanchez-Madrid F, Dawson HN, Vitek MP, Perry G, Smith MA, Avila J (2009) Tau – an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *Journal of Neurochemistry* 109:1756-1766.
- Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LH, Koo EH (1997) The beta-amyloid precursor protein of Alzheimer's disease enhances neuron viability and modulates neuronal polarity. *J Neurosci* 17:9407-9414.
- Pernet V, Di Polo A (2006) Synergistic action of brain-derived neurotrophic factor and lens injury promotes retinal ganglion cell survival, but leads to optic nerve dystrophy *in vivo*. *Brain* 129:1014-1026.
- Perry VH (1981) Evidence for an amacrine cell system in the ganglion cell layer of the rat retina. *Neurosci* 6:931-944.

- Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, Taylor J, Snyder H, Grover A, De Lucia M, McGowan E, Lewis J, Prihar G, Kim J, Dillmann WH, Browne SE, Hall A, Voellmy R, Tsuboi Y, Dawson TM, Wolozin B, Hardy J, Hutton M (2004) CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Human molecular genetics* 13:703-714.
- Petry FR, Pelletier J, Bretteville A, Morin F, Calon F, Hébert SS, Whittington RA, Planel E (2014) Specificity of anti-tau antibodies when analyzing mice models of Alzheimer's disease: problems and solutions. *PLoS ONE* 9:e94251.
- Pfeiffer N, Bach M (1992) The pattern-electroretinogram in glaucoma and ocular hypertension. A cross-sectional and longitudinal study. *German journal of ophthalmology* 1:35-40.
- Planel E, Sun X, Takashima A (2002) Role of GSK-3 $\beta$  in Alzheimer's disease pathology. *Drug Development Research* 56:491-510.
- Planel E, Yasutake K, Fujita SC, Ishiguro K (2001) Inhibition of Protein Phosphatase 2A Overrides Tau Protein Kinase I/Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  and Cyclin-dependent Kinase 5 Inhibition and Results in Tau Hyperphosphorylation in the Hippocampus of Starved Mouse. *Journal of Biological Chemistry* 276:34298-34306.
- Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui D-H, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2401-2411.
- Planel E, Richter KEG, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau L-F, Duff KE (2007) Anesthesia Leads to Tau Hyperphosphorylation through Inhibition of Phosphatase Activity by Hypothermia. *The Journal of Neuroscience* 27:3090-3097.
- Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA (2003) The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23:5531-5535.
- Plouffe V, Mohamed NV, Rivest-McGraw J, Bertrand J, Lauzon M, Leclerc N (2012) Hyperphosphorylation and cleavage at D421 enhance tau secretion. *PLoS One* 7:e36873.

- Pooler AM, Phillips EC, Lau DHW, Noble W, Hanger DP (2013) Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep* 14:389-394.
- Porzig R, Singer D, Hoffmann R (2007) Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 358:644-649.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenue A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456-1464.
- Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu Y, Prina AM (2015) *World Alzheimer Report 2015: The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, costs and trends.* London: Alzheimer's Disease International.
- Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F, Bennink JR, Yewdell JW (2003) Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18:343-354.
- Prut L, Abramowski D, Krucker T, Levy CL, Roberts AJ, Staufenbiel M, Wiessner C (2007) Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behavioural brain research* 179:107-110.
- Qu J, Matsouaka R, Betensky RA, Hyman BT, Grosskreutz CL (2012) Calcineurin activation causes retinal ganglion cell degeneration. *Molecular Vision* 18:2828-2838.
- Quigley HA (2011) Glaucoma. *The Lancet* 377:1367-1377.
- Quigley HA, Addicks EM (1981) Regional Differences in the Structure of the Lamina Cribrosa and Their Relation to Glaucomatous Optic Nerve Damage. *Archives of Ophthalmology* 99:137-143.
- Quigley HA, Broman AT (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *The British journal of ophthalmology* 90:262-267.
- Quigley HA, Addicks EM, Green W, Maumenee AE (1981) Optic nerve damage in human glaucoma: II. the site of injury and susceptibility to damage. *Archives of Ophthalmology* 99:635-649.

- Quigley HA, Katz J, Derick RJ, Gilbert D, Sommer A (1992) An evaluation of optic disc and nerve fiber layer examinations in monitoring progression of early glaucoma damage. *Ophthalmology* 99:19-28.
- Quigley HA, Enger C, Katz J, Sommer A, Scott R, Gilbert D (1994) Risk factors for the development of glaucomatous visual field loss in ocular hypertension. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 112:644-649.
- Quigley HA, McKinnon SJ, Zack DJ, Pease ME, Kerrigan-Baumrind LA, Kerrigan DF, Mitchell RS (2000) Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3460-3466.
- Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, Calhoun ME, Jaggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Holscher C, Mathews PM, Jucker M (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO reports* 7:940-946.
- Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A (2002) Tau is essential to  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6364-6369.
- Rasband MN (2010) The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11:552-562.
- Raza AS, Cho J, de Moraes CG, Wang M, Zhang X, Kardon RH, Liebmann JM, Ritch R, Hood DC (2011) Retinal ganglion cell layer thickness and local visual field sensitivity in glaucoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 129:1529-1536.
- Redfern WS, Storey S, Tse K, Hussain Q, Maung KP, Valentin JP, Ahmed G, Bigley A, Heathcote D, McKay JS (2011) Evaluation of a convenient method of assessing rodent visual function in safety pharmacology studies: effects of sodium iodate on visual acuity and retinal morphology in albino and pigmented rats and mice. *J Pharmacol Toxicol Methods* 63:102-114.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Muller UC (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci* 27:7817-7826.

- Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, LaFerla FM, Rohn TT, Cotman CW (2004) Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *Journal of Clinical Investigation* 114:121-130.
- Rizzo M, Anderson SW, Dawson J, Nawrot M (2000) Vision and cognition in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 38:1157-1169.
- Robakis NK, Ramakrishna N, Wolfe G, Wisniewski HM (1987) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4190-4194.
- Robel S, Sontheimer H (2016) Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nat Neurosci* 19:28-33.
- Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Cheng IH, Wu T, Gerstein H, Yu GQ, Mucke L (2007) Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316:750-754.
- Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, Yao J, Chin J, Yan F, Wu T, Hamto P, Devidze N, Yu GQ, Palop JJ, Noebels JL, Mucke L (2011) Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:700-711.
- Robertson LA, Moya KL, Breen KC (2004) The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 6:489-495.
- Rodríguez-Martín T, Pooler AM, Lau DHW, Mórótz GM, De Vos KJ, Gilley J, Coleman MP, Hanger DP (2016) Reduced number of axonal mitochondria and tau hypophosphorylation in mouse P301L tau knockin neurons. *Neurobiology of Disease* 85:1-10.
- Rodríguez-Navarro JA, Rodríguez L, Casarejos MJ, Solano RM, Gómez A, Perucho J, Cuervo AM, García de Yébenes J, Mena MA (2010) Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiology of Disease* 39:423-438.

- Roh M, Zhang Y, Murakami Y, Thanos A, Lee SC, Vavvas DG, Benowitz LI, Miller JW (2012) Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *PLoS One* 7:e40065.
- Rosen RF, Fritz JJ, Dooyema J, Cintron AF, Hamaguchi T, Lah JJ, Levine Iii H, Jucker M, Walker LC (2012) Exogenous seeding of cerebral  $\beta$ -amyloid deposition in  $\beta$ aPP-transgenic rats. *Journal of Neurochemistry* 120:660-666.
- Rosner H, Rebhan M, Vacun G, Vanmechelen E (1995) Developmental expression of tau proteins in the chicken and rat brain: rapid down-regulation of a paired helical filament epitope in the rat cerebral cortex coincides with the transition from immature to adult tau isoforms. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 13:607-617.
- Roth W, Reed JC (2002) Apoptosis and cancer: When BAX is TRAILing away. *Nat Med* 8:216-218.
- Ruben ST, Arden GB, O'Sullivan F, Hitchings RA (1995) Pattern electroretinogram and peripheral colour contrast thresholds in ocular hypertension and glaucoma: comparison and correlation of results. *The British journal of ophthalmology* 79:326-331.
- Ruiz-Ederra J, Verkman AS (2006) Mouse model of sustained elevation in intraocular pressure produced by episcleral vein occlusion. *Experimental eye research* 82:879-884.
- Sadun AA, Bassi CJ (1990) Optic nerve damage in Alzheimer's disease. *Ophthalmology* 97:9-17.
- Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen S-H, Takashima A (2007) Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci* 25:3020-3029.
- Saibil H (2013) Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:630-642.
- Sala Frigerio C, De Strooper B (2016) Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics. *Annu Rev Neurosci* 39:57-79.
- Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, Jimenez-Lopez M, Mayor-Torroglosa S, Aviles-Trigueros M, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M (2010) Ocular hypertension impairs optic

- nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Experimental eye research* 90:168-183.
- Salt TE, Nizari S, Cordeiro MF, Russ H, Danysz W (2014) Effect of the A $\beta$  Aggregation Modulator MRZ-99030 on Retinal Damage in an Animal Model of Glaucoma. *Neurotox Res* 26:440-446.
- Samson AL, Borg RJ, Niego B, Wong CH, Crack PJ, Yongqing T, Medcalf RL (2009) A nonfibrin macromolecular cofactor for tPA-mediated plasmin generation following cellular injury. *Blood* 114:1937-1946.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.
- Sappington RM, Sidorova T, Long DJ, Calkins DJ (2009) TRPV1: Contribution to Retinal Ganglion Cell Apoptosis and Increased Intracellular Ca<sup>2+</sup> with Exposure to Hydrostatic Pressure. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50:717-728.
- Sappington RM, Carlson BJ, Crish SD, Calkins DJ (2010) The Microbead Occlusion Model: A Paradigm for Induced Ocular Hypertension in Rats and Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51:207-216.
- Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, Rainone V, Nemni R, Mancuso R, Clerici M (2016) The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration* 11:1-14.
- Sasaoka M, Taniguchi T, Shimazawa M, Ishida N, Shimazaki A, Hara H (2006) Intravitreal injection of endothelin-1 caused optic nerve damage following to ocular hypoperfusion in rabbits. *Experimental eye research* 83:629-637.
- Sawada A, Neufeld AH (1999) Confirmation of the rat model of chronic, moderately elevated intraocular pressure. *Experimental eye research* 69:525-531.
- Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, Tolnay M, Winkler DT, Goedert M (2012) Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* 135:2169-2177.



- Schlamp CL, Li Y, Dietz JA, Janssen KT, Nickells RW (2006) Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neuroscience* 7:1-14.
- Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkow E, Mandelkow EM (1999) Phosphorylation that Detaches Tau Protein from Microtubules (Ser262, Ser214) Also Protects It against Aggregation into Alzheimer Paired Helical Filaments. *Biochemistry* 38:3549-3558.
- Scholl M, Lockhart SN, Schönhaut DR, O'Neil JP, Janabi M, Ossenkuppele R, Baker SL, Vogel JW, Faria J, Schwimmer HD, Rabinovici GD, Jagust WJ (2016) PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron* 89:971-982.
- Scholz M, Buder T, Seeber S, Adamek E, Becker C-M, Lütjen-Drecoll E (2008) Dependency of Intraocular Pressure Elevation and Glaucomatous Changes in DBA/2J and DBA/2J-Rj Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49:613-621.
- Scholz T, Mandelkow E (2014) Transport and diffusion of tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci* 71:3139-3150.
- Schön C, Hoffmann NA, Ochs SM, Burgold S, Filser S, Steinbach S, Seeliger MW, Arzberger T, Goedert M, Kretschmar HA, Schmidt B, Herms J (2012) Long-term *in vivo* imaging of fibrillar tau in the retina of P301S transgenic mice. *PLoS ONE* 7:e53547.
- Schuettauf F, Quinto K, Naskar R, Zurakowski D (2002) Effects of anti-glaucoma medications on ganglion cell survival: the DBA/2J mouse model. *Vision Research* 42:2333-2337.
- Schwarz AJ, Yu P, Miller BB, Shcherbinin S, Dickson J, Navitsky M, Joshi AD, Devous MD, Sr., Mintun MS (2016) Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages. *Brain* 139:1539-1550.
- Seitz A, Kojima H, Oiwa K, Mandelkow EM, Song YH, Mandelkow E (2002) Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *Embo j* 21:4896-4905.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.

- Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin M-L, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S, Buée L (2008) Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 5:207-224.
- Shackelford D, Yeh R (1998) Dephosphorylation of tau during transient forebrain ischemia in the rat. *Mol Chem Neuropathol* 34:103-120.
- Shackelford DA, Nelson KE (1996) Changes in phosphorylation of  $\tau$  during ischemia and reperfusion in the rabbit spinal cord. *J Neurochem* 66:286-295.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid  $\beta$ -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nature medicine* 14:837-842.
- Shimojo M, Sahara N, Murayama M, Ichinose H, Takashima A (2007) Decreased Abeta secretion by cells expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *Neuroscience research* 57:446-453.
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS (2004) CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279:4869-4876.
- Shorter J (2011) The Mammalian Disaggregase Machinery: Hsp110 Synergizes with Hsp70 and Hsp40 to Catalyze Protein Disaggregation and Reactivation in a Cell-Free System. *PLoS ONE* 6:e26319.
- Shou T, Liu J, Wang W, Zhou Y, Zhao K (2003) Differential dendritic shrinkage of  $\alpha$  and  $\beta$  retinal ganglion cells in cats with chronic glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44:3005-3010.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien J-P, Rivest S (2006) Bone Marrow-Derived Microglia Play a Critical Role in Restricting Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Neuron* 49:489-502.
- Simon D, Garcia-Garcia E, Royo F, Falcon-Perez JM, Avila J (2012) Proteostasis of tau. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *FEBS Lett* 586:47-54.

- Sin BH, Song BJ, Park SP (2013) Aqueous vascular endothelial growth factor and endothelin-1 levels in branch retinal vein occlusion associated with normal tension glaucoma. *Journal of glaucoma* 22:104-109.
- Sipe JD, Cohen AS (2000) Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* 130:88-98.
- Sisodia SS (1992) Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:6075-6079.
- Sit AJ (2014) Intraocular pressure variations: causes and clinical significance. *Can J Ophthalmol* 49:484-488.
- Slomnicki LP, Lesniak W (2008) A putative role of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD) in transcription. *Acta neurobiologiae experimentalis* 68:219-228.
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- $\beta$ . *Nat Neurosci* 8:1051-1058.
- Sommer A (1996) Glaucoma: Facts and fancies. *Eye* 10:295-301.
- Sommer A, Tielsch JM, Katz J, Quigley HA, Gottsch JD, Javitt J, Singh K (1991) Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans. The Baltimore Eye Survey. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 109:1090-1095.
- Song A-h, Wang D, Chen G, Li Y, Luo J, Duan S, Poo M-m (2009) A Selective Filter for Cytoplasmic Transport at the Axon Initial Segment. *Cell* 136:1148-1160.
- Soto C (2011) Prion hypothesis: the end of the controversy? *Trends in Biochemical Sciences* 36:151-158.
- Spangenberg EE, Green KN (2016) Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav Immun.*
- Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT (2006) Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* 168:1598-1607.

- Sriram P, Graham SL, Wang C, Yiannikas C, Garrick R, Klistorner A (2012) Transsynaptic Retinal Degeneration in Optic Neuropathies: Optical Coherence Tomography Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53:1271-1275.
- Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Brück W, Jellinger K, Lassmann H (1999) Activation of Caspase-3 in Single Neurons and Autophagic Granules of Granulovacuolar Degeneration in Alzheimer's Disease: Evidence for Apoptotic Cell Death. *The American journal of pathology* 155:1459-1466.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow E-M (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of Cell Biology* 156:1051-1063.
- Stein TD et al. (2015) Beta-amyloid deposition in chronic traumatic encephalopathy. *Acta neuropathologica* 130:21-34.
- Stover KR, Campbell MA, Van Winsen CM, Brown RE (2015) Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 289:29-38.
- Swaroop A, Kim D, Forrest D (2010) Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 11:563-576.
- Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spire-Jones TL, Hyman BT (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *The American journal of pathology* 181:1426-1435.
- Tamagno E, Parola M, Bardini P, Piccini A, Borghi R, Guglielmotto M, Santoro G, Davit A, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M (2005)  $\beta$ -site APP cleaving enzyme up-regulation induced by 4-hydroxynonenal is mediated by stress-activated protein kinases pathways. *Journal of Neurochemistry* 92:628-636.
- Tamura H, Kawakami H, Kanamoto T, Kato T, Yokoyama T, Sasaki K, Izumi Y, Matsumoto M, Mishima HK (2006) High frequency of open-angle glaucoma in Japanese patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 246:79-83.

- Tan O, Chopra V, Lu AT-H, Schuman JS, Ishikawa H, Wollstein G, Varma R, Huang D (2009) Detection of Macular Ganglion Cell Loss in Glaucoma by Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology* 116:2305-2314.e2302.
- Tanabe C, Hotoda N, Sasagawa N, Sehara-Fujisawa A, Maruyama K, Ishiura S (2007) ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP alpha-secretase in A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352:111-117.
- Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2005) Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 166:1761-1771.
- Tanzi RE, Bertram L (2005) Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell* 120:545-555.
- Tatham AJ, Weinreb RN, Medeiros FA (2014) Strategies for improving early detection of glaucoma: the combined structure-function index. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 8:611-621.
- Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC (2008) Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis* 31:250-260.
- Tepper K, Biernat J, Kumar S, Wegmann S, Timm T, Hübschmann S, Redecke L, Mandelkow E-M, Müller DJ, Mandelkow E (2014) Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells. *J Biol Chem* 289:34389-34407.
- Terry R (2000) Do neuronal inclusions kill the cell? *J Neural Transm Suppl* 59:91-93.
- Tezel G, Yang X (2004) Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, *in vitro*. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 45:4049-4059.
- Tezel G, Kass MA, Kolker AE, Wax MB (1996) Comparative optic disc analysis in normal pressure glaucoma, primary open-angle glaucoma, and ocular hypertension. *Ophthalmology* 103:2105-2113.
- Tezel Gln, Li LY, Patil RV, Wax MB (2001) TNF- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  Receptor-1 in the Retina of Normal and Glaucomatous Eyes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42:1787-1794.

- Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A $\beta$ -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58:1791-1800.
- Tham Y-C, Li X, Wong TY, Quigley HA, Aung T, Cheng C-Y (2014) Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 121:2081-2090.
- Thies E, Mandelkow EM (2007) Missorting of tau in neurons causes degeneration of synapses that can be rescued by the kinase MARK2/Par-1. *Journal of Neuroscience* 27:2896-2907.
- Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *The Journal of Biological Chemistry* 283:29615-29619.
- Tielsch JM, Sommer A, Katz J, Royall RM, Quigley HA, Javitt J (1991) Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Jama* 266:369-374.
- Trinchese F, Liu S, Battaglia F, Walter S, Mathews PM, Arancio O (2004) Progressive age-related development of Alzheimer-like pathology in APP/PS1 mice. *Annals of neurology* 55:801-814.
- Tsai CS, Ritch R, Schwartz B, Lee SS, Miller NR, Chi T, Hsieh FY (1991) Optic nerve head and nerve fiber layer in Alzheimer's disease. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 109:199-204.
- Tyler SJ, Dawbarn D, Wilcock GK, Allen SJ (2002)  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299:373-376.
- Uhlmann RF, Larson EB, Koepsell TD, Rees TS, Duckert LG (1991) Visual impairment and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of general internal medicine* 6:126-132.
- Utton MA, Connell J, Asuni AA, van Slegtenhorst M, Hutton M, de Silva R, Lees AJ, Miller CCJ, Anderton BH (2002) The Slow Axonal Transport of the Microtubule-Associated Protein Tau and the Transport Rates of Different Isoforms and Mutants in Cultured Neurons. *The Journal of Neuroscience* 22:6394-6400.
- van de Nes JAP, Nafe R, Schlote W (2008) Non-tau based neuronal degeneration in Alzheimer's disease — an immunocytochemical and quantitative study in the supragranular layers of the middle temporal neocortex. *Brain Res* 1213:152-165.

- Vickery HB (1950) The Origin of the Word Protein. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 22:387-393.
- Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolas FM, Alarcon-Martinez L, Valiente-Soriano FJ, de Imperial JM, Aviles-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Perez MP (2012) Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res* 31:1-27.
- Vidal-Sanz M, Valiente-Soriano FJ, Ortín-Martínez A, Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Alarcón-Martínez L, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP (2015) Retinal neurodegeneration in experimental glaucoma. In: *Prog Brain Res* (Giacinto B, Carlo N, eds), pp 1-35: Elsevier.
- Villemagne VL, Pike KE, Chetelat G, Ellis KA, Mulligan RS, Bourgeat P, Ackermann U, Jones G, Szoek C, Salvado O, Martins R, O'Keefe G, Mathis CA, Klunk WE, Ames D, Masters CL, Rowe CC (2011) Longitudinal assessment of Abeta and cognition in aging and Alzheimer disease. *Annals of neurology* 69:181-192.
- Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Experimental neurology* 168:402-412.
- Vogt BA, Vogt LJ, Vrana KE, Gioia L, Meadows RS, Challa VR, Hof PR, Van Hoesen GW (1998) Multivariate analysis of laminar patterns of neurodegeneration in posterior cingulate cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 153:8-22.
- von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow E-M, Mandelkow E (2000) Assembly of  $\tau$  protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming  $\beta$  structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:5129-5134.
- Voss K, Combs B, Patterson KR, Binder LI, Gamblin TC (2012) Hsp70 alters tau function and aggregation in an isoform specific manner. *Biochemistry* 51:888-898.

- Waldron E, Isbert S, Kern A, Jaeger S, Martin AM, Hebert SS, Behl C, Weggen S, De Strooper B, Pietrzik CU (2008) Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription. *Experimental cell research* 314:2419-2433.
- Waller A (1850) Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 140:423-429.
- Wang F, Durfee LA, Huibregtse JM (2013) A cotranslational ubiquitination pathway for quality control of misfolded proteins. *Molecular cell* 50:368-378.
- Wang J-Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Restoration of biological activity of Alzheimer abnormally phosphorylated  $\tau$  by dephosphorylation with protein phosphatase-2A, -2B and -1. *Molecular Brain Research* 38:200-208.
- Wang J-Z, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European Journal of Neuroscience* 25:59-68.
- Wang M, Hood DC, Cho JS, Ghadiali Q, De Moraes CG, Zhang X, Ritch R, Liebmann JM (2009) Measurement of local retinal ganglion cell layer thickness in patients with glaucoma using frequency-domain optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 127:875-881.
- Wang Y, Mandelkow E (2012) Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways. *Biochem Soc Trans* 40:644-652.
- Wang YP, Biernat J, Pickhardt M, Mandelkow E, Mandelkow E-M (2007b) Stepwise proteolysis liberates tau fragments that nucleate the Alzheimer-like aggregation of full-length tau in a neuronal cell model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:10252-10257.
- Ward NJ, Ho KW, Lambert WS, Weitlauf C, Calkins DJ (2014) Absence of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 Accelerates Stress-Induced Axonopathy in the Optic Projection. *The Journal of Neuroscience* 34:3161-3170.
- Watanabe M, Sawai H, Fukuda Y (1997) Survival of axotomized retinal ganglion cells in adult mammals. *Clinical neuroscience (New York, NY)* 4:233-239.



- Weber AJ, Kaufman PL, Hubbard WC (1998) Morphology of single ganglion cells in the glaucomatous primate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2304-2320.
- Weggen S, Beher D (2012) Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* 4:1-14.
- Wegmann S, Maury EA, Kirk MJ, Saqran L, Roe A, DeVos SL, Nicholls S, Fan Z, Takeda S, Cagsal-Getkin O, William CM, Spires-Jones TL, Pitstick R, Carlson GA, Pooler AM, Hyman BT (2015) Removing endogenous tau does not prevent tau propagation yet reduces its neurotoxicity. *Embo j* 34:3028-3041.
- Weinreb RN, Aung T, Medeiros FA (2014) The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma: A Review. *Jama* 311:1901-1911.
- Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E, Esler WP, Maggio JE, Mantyh PW (1998) Fibrillar  $\beta$ -Amyloid Induces Microglial Phagocytosis, Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase, and Loss of a Select Population of Neurons in the Rat CNS *In vivo*. *The Journal of Neuroscience* 18:2161-2173.
- Wen Y, Onyewuchi O, Yang S, Liu R, Simpkins JW (2004) Increased  $\beta$ -secretase activity and expression in rats following transient cerebral ischemia. *Brain Research* 1009:1-8.
- Wen Y, Yu WH, Maloney B, Bailey J, Ma J, Marie I, Maurin T, Wang L, Figueroa H, Herman M, Krishnamurthy P, Liu L, Planel E, Lau LF, Lahiri DK, Duff K (2008) Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron* 57:680-690.
- Westermarck P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD (2007) A primer of amyloid nomenclature. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis* 14:179-183.
- Weuve J, Hebert LE, Scherr PA, Evans DA (2014) Deaths in the United States among persons with Alzheimer's disease (2010-2050). *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 10:e40-46.

- Whitmore AV, Libby RT, John SW (2005) Glaucoma: thinking in new ways-a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? *Prog Retin Eye Res* 24:639-662.
- Williams MA, McGowan AJ, Cardwell CR, Cheung CY, Craig D, Passmore P, Silvestri G, Maxwell AP, McKay GJ (2015) Retinal microvascular network attenuation in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 1:229-235.
- Wilson AM, Di Polo A (2012) Gene therapy for retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Gene Ther* 19:127-136.
- Wilson AM, Chiodo VA, Boye SL, Brecha NC, Hauswirth WW, Di Polo A (2014) Inhibitor of Apoptosis-Stimulating Protein of p53 (iASPP) Is Required for Neuronal Survival after Axonal Injury. *PLoS ONE* 9:e94175.
- Wilson AM, Morquette B, Abdouh M, Unsain N, Barker PA, Feinstein E, Bernier G, Di Polo A (2013) ASPP1/2 Regulate p53-Dependent Death of Retinal Ganglion Cells through PUMA and Fas/CD95 Activation *In vivo*. *J Neurosci* 33:2205-2216.
- Wilson M, Hertzmark E, Walker AM, Childs-Shaw K, Epstein DL (1987) A case-control study of risk factors in open angle glaucoma. *Archives of Ophthalmology* 105:1066-1071.
- Winblad B et al. (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet Neurology* 15:455-532.
- Wirak DO, Bayney R, Kundel CA, Lee A, Scangos GA, Trapp BD, Unterbeck AJ (1991) Regulatory region of human amyloid precursor protein (APP) gene promotes neuron-specific gene expression in the CNS of transgenic mice. *The EMBO Journal* 10:289-296.
- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293:711-714.
- Wu J-H, Zhang S-H, Gao F-J, Lei Y, Chen X-Y, Gao F, Zhang S-J, Sun X-h (2013a) RNAi screening identifies GSK3 $\beta$  as a regulator of DRP1 and the neuroprotection of lithium chloride against elevated pressure involved in downregulation of DRP1. *Neuroscience letters* 554:99-104.

- Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, Steinberg JI, Margittai M, Kayed R, Zurzolo C, Di Paolo G, Duff KE (2013b) Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem* 288:1856-1870.
- Wyatt AR, Yerbury JJ, Dabbs RA, Wilson MR (2012) Roles of Extracellular Chaperones in Amyloidosis. *Journal of Molecular Biology* 421:499-516.
- Wyatt AR, Yerbury JJ, Ecroyd H, Wilson MR (2013) Extracellular chaperones and proteostasis. *Annual review of biochemistry* 82:295-322.
- Wyss-Coray T (2006) Inflammation in Alzheimer disease: Driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine* 12:1005-1015.
- Xie H, Hou S, Jiang J, Sekutowicz M, Kelly J, Bacskai BJ (2013) Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:7904-7909.
- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996) RAGE and amyloid-[beta] peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685-691.
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang XL, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, Li R, Shen Y (2003) Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9:3-4.
- Yasumura R et al. (2011) Investigation of the association between SLC1A3 gene polymorphisms and normal tension glaucoma. *Molecular Vision* 17:792-796.
- Yerbury JJ, Ooi L, Dillin A, Saunders DN, Hatters DM, Beart PM, Cashman NR, Wilson MR, Ecroyd H (2016) Walking the tightrope: proteostasis and neurodegenerative disease. *J Neurochem* 137:489-505.
- Yin Y, Cui Q, Li Y, Irwin N, Fischer D, Harvey AR, Benowitz LI (2003) Macrophage-derived factors stimulate optic nerve regeneration. *J Neurosci* 23:2284-2293.

- Yoneda S, Hara H, Hirata A, Fukushima M, Inomata Y, Tanihara H (2005) Vitreous fluid levels of beta-amyloid((1-42)) and tau in patients with retinal diseases. *Japanese journal of ophthalmology* 49:106-108.
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53:337-351.
- Yu S, Tanabe T, Yoshimura N (2006) A rat model of glaucoma induced by episcleral vein ligation. *Experimental eye research* 83:758-770.
- Xia D, Li C, Götz J (2015) Pseudophosphorylation of Tau at distinct epitopes or the presence of the P301L mutation targets the microtubule-associated protein Tau to dendritic spines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852:913-924.
- Zamora-Leon SP, Lee G, Davies P, Shafit-Zagardo B (2001) Binding of Fyn to MAP-2c through an SH3 binding domain. Regulation of the interaction by ERK2. *J Biol Chem* 276.
- Zempel H, Mandelkow E (2014) Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci* 37:721-732.
- Zempel H, Mandelkow E-M (2015) Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia. *Molecular neurodegeneration* 10:1-12.
- Zempel H, Luedtke J, Kumar Y, Biernat J, Dawson H, Mandelkow E, Mandelkow EM (2013) Amyloid- $\beta$  oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TLL6 and spastin. *EMBO J* 32:2920-2937.
- Zeyen TG, Caprioli J (1993) Progression of disc and field damage in early glaucoma. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 111:62-65.
- Zhang X, Zhou K, Wang R, Cui J, Lipton SA, Liao FF, Xu H, Zhang YW (2007) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation. *J Biol Chem* 282:10873-10880.

Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular neurodegeneration* 1:5-5.

Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V (1998) AnkyrinG Is Required for Clustering of Voltage-gated Na Channels at Axon Initial Segments and for Normal Action Potential Firing. *The Journal of Cell Biology* 143:1295-1304.

Zhu X, Lee HG, Raina AK, Perry G, Smith MA (2002) The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Alzheimer's Disease. *Neurosignals* 11:270-281.

Zilka N, Filipcik P, Koson P, Fialova L, Skrabana R, Zilkova M, Rolkova G, Kontseikova E, Novak M (2006) Truncated tau from sporadic Alzheimer's disease suffices to drive neurofibrillary degeneration *in vivo*. *FEBS Letters* 580:3582-3588.

## **Annexe A**

### Contributions aux articles

L'article intitulé « **Tau accumulation, altered phosphorylation, and missorting promote neurodegeneration in glaucoma** » (chapitre III de la thèse) est le fruit du projet de recherche conçu par mon superviseur le Dr Di Polo en collaboration avec le Dr Leclerc. J'étais responsable de l'acquisition, de l'analyse, et de l'interprétation des résultats. L'étude était menée sur des rats Brown Norway adultes chez lesquels j'ai induit le glaucome avec l'assistance de Mmes Dara O'Connor et Florence Dotigny. Les données de pression intraoculaire furent générées par le Dr Cueva-Vargas et moi. Toutes les injections intraoculaires d'ARN d'interférence ont été effectuées par moi. J'ai assuré la collecte des échantillons de rétine et de nerf optique chez les sujets glaucomateux et contrôles. J'ai réalisé les expériences de western blot, d'immunohistochimie et de survie. La RT-PCR (figure 2D) fut réalisée par Mme Destroismaisons sous la supervision du Dr Vande Velde. Le comptage des axones de rétines naïves traitées avec ARN d'interférences anti-tau (colonne gris clair de la figure 7H du chapitre III) fut effectué par le Dr Cueva-Vargas. J'ai préparé les figures de l'article et le Dr Di Polo et moi avons rédigé le manuscrit.

Dans le second article « **Tau accumulation in the retina of a murine model of Alzheimer's disease precedes brain pathology and promotes retinal ganglion cell dysfunction** » (chapitre IV), le Dr Di Polo et moi avons conçu et planifié les expériences. J'étais responsable de l'acquisition, l'analyse, et l'interprétation des résultats. L'étude était menée sur des souris 3xTg et leurs contrôles sauvages. J'ai prélevé les échantillons de rétine et de nerf optique tandis que Mme Dotigny s'est occupée de la collecte des échantillons de cerveau (hippocampe et cortex).

J'ai réalisé toutes les expériences de western blot, d'immunohistochimie et de survie des CGR. La RT-PCR fut réalisée par Mme Destroismaisons sous la supervision du Dr Vande Velde (Figure 3C). L'évaluation de l'absorption et du transport antérograde de CT $\beta$  par les CGR fut intégralement menée par le Dr Alarcon-Martinez (figure 7 du chapitre IV). J'ai préparé les figures de l'article et le Dr Di Polo et moi avons rédigé le manuscrit.

## Annexe B

### Expression de tau et de la kinase Fyn dans la rétine glaucomateuse

#### **Figure 1. L'hypertension oculaire engendre la hausse de l'expression de Fyn dans la rétine.**

(A-C), Dans la rétine intacte, l'expression de Fyn est faible et restreinte à la couche des cellules ganglionnaires où elle ne co-localise pas avec tau. Trois semaines après induction du glaucome, Fyn apparaît dans la couche plexiforme interne tandis que son niveau augmente dans la couche des cellules ganglionnaire. De manière intéressante tau co-localise avec Fyn notamment dans la couche plexiforme interne. La hausse concomitante de Fyn et de tau dans la couche où se trouvent les dendrites des CGR suggère que Fyn est le médiateur de la toxicité de tau sur les CGR. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m

#### **Figure 2. La réduction de tau diminue l'expression de Fyn dans la rétine glaucomateuse.**

(A-C) En accord avec les résultats précédents, Fyn est fortement exprimée dans la rétine glaucomateuse traitée avec de l'ARN d'interférence contrôle. (D-F) Par contre, la délétion de tau avec de l'ARN d'interférence anti-tau provoque la réduction du niveau rétinien de Fyn, démontrant ainsi que la hausse de Fyn dans la rétine glaucomateuse se fait de manière tau-dépendante. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m

Pris dans l'ensemble ces résultats suggèrent que la hausse du niveau de tau dans la rétine glaucomateuse stimule le recrutement de Fyn dans le terminal postsynaptique des CGR où il provoque l'hyperactivation des récepteurs NMDA ce qui résulte en la mort des neurones par excitotoxicité.



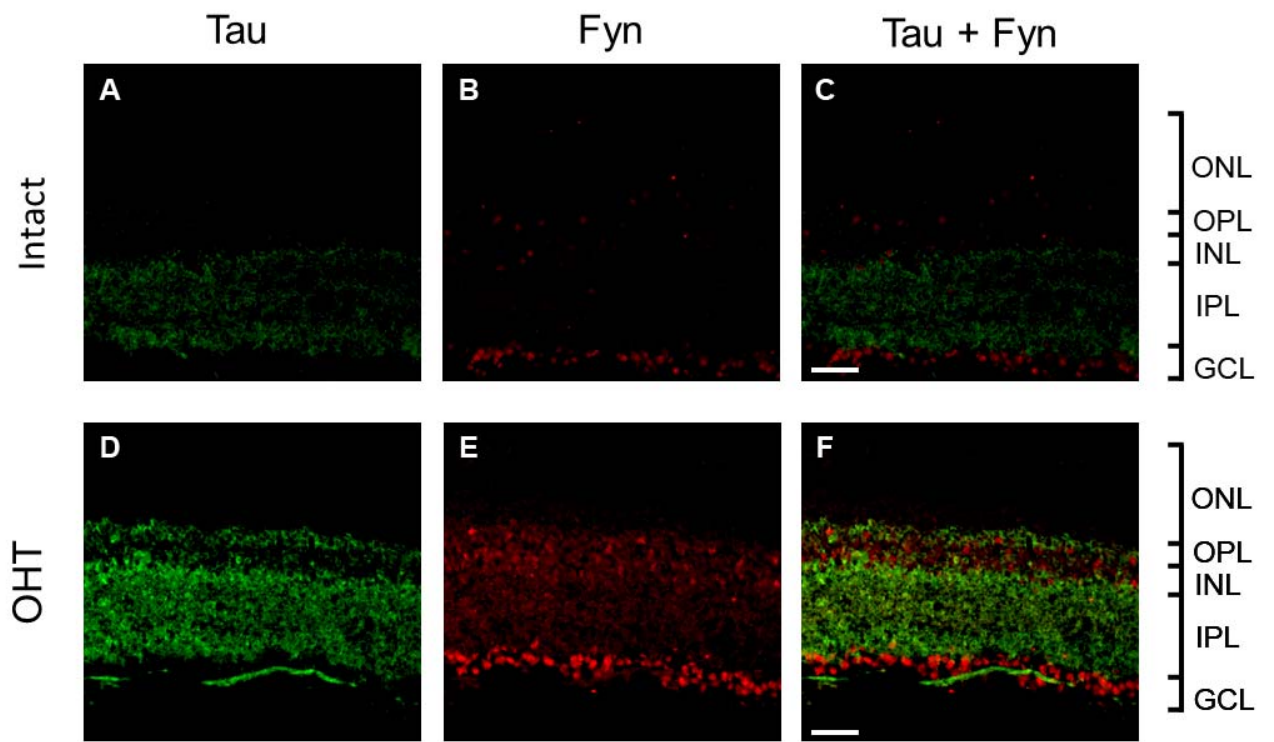


Figure 1

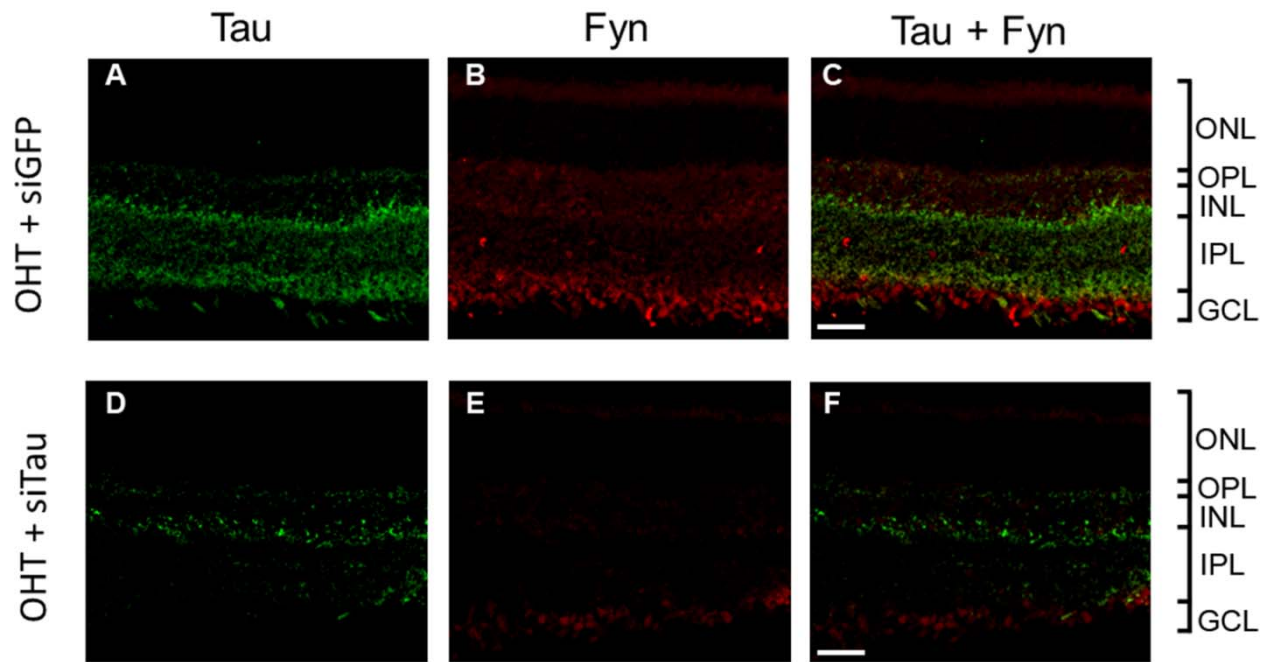


Figure 2