

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Neurosciences - Neurobiologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Marie-Lise Frandemiche

Thèse dirigée par **Alain BUISSON**

préparée au sein de l'**institut des Neurosciences de Grenoble INSERM U836 – Equipe Neuropathologies et Dysfonctions Synaptiques**

dans l'**École Doctorale de Chimie et Sciences du vivant**

Etude de la dynamique de tau dans le compartiment synaptique dans un contexte physiologique et pathologique : exemple de la maladie d'Alzheimer

Thèse soutenue publiquement le **11 décembre 2013**
devant le jury composé de :

Dr. Nicolas SERGEANT

Directeur de recherche - JPARC - Lille - **Rapporteur**

Pr. Michel VIGNES

Professeur - Université de Montpellier - **Rapporteur**

Dr. Patrick DUTAR

Directeur de recherche - CPN - Paris - **Examineur**

Pr. Rémy SADOUL

Professeur - Université Joseph Fourier - Grenoble - **Examineur**

Pr. Alain BUISSON

Professeur - Université Joseph Fourier - Grenoble - **Directeur de thèse**



à mes parents

à Antoine

« La recherche doit avant tout être un jeu et un plaisir »
de Pierre Joliot, extrait de *La recherche passionnément*

« Rien ne vaut la recherche lorsqu'on veut trouver quelque chose »
de J.R.R. Tolkien, extrait de *Bilbo le Hobbit*.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres de mon jury, le Docteur Nicolas Sergeant, le Professeur Michel Vignes, le Docteur Patrick Dutar et le Professeur Rémy Sadoul pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner ce travail. Je remercie en particulier le Professeur Michel Vignes, malgré un emploi du temps très chargé, d'avoir accepté d'être mon rapporteur et d'avoir analysé mon manuscrit et mon travail effectué durant ces trois années de doctorat. Je remercie particulièrement le Docteur Nicolas Sergeant, qui en plus d'avoir analysé et évalué mon travail de thèse, a aussi suivi mon travail de loin (à 800km) durant ces trois années et même avant, et de m'avoir transformé en « Tau-iste » pure et dure et de m'avoir souvent donné des conseils scientifiques plus qu'utiles.

Je remercie le Pr. Claude Feuerstein et le Dr. Frédéric Saudou de m'avoir hébergée au sein de l'institut des Neurosciences de Grenoble dans l'unité Inserm U836.

Je voudrais remercier le Pr. Alain Buisson, que j'ai d'abord rencontré à l'Université de Caen Basse-Normandie, qui m'a donné l'envie de faire des neurosciences lors de cours d'introduction aux neurosciences en licence 2. C'est de façon fortuite que l'on s'est croisé au centre Cycleron en juillet 2010 où tu m'as proposé de venir faire une thèse à Grenoble dans un laboratoire où tout était à construire. Cette thèse était un challenge et je l'ai accepté. Je ne sais pas si j'ai vraiment relevé le défi, mais je considère aujourd'hui la chance que j'ai eu d'apprendre beaucoup de choses autant scientifiques que pratiques. Tu m'as laissé carte blanche sur tout, et même si souvent j'ai eu l'impression d'être en chute libre sans parachute, j'ai pu laisser libre cours à mon imagination, peut-être un peu trop débordante des fois, et c'est vrai que ça n'a pas été facile tous les jours ; cependant, je comprends aujourd'hui que tu m'as fait confiance pour mener ma barque, et pour cela, je te remercie. Je te remercie de m'avoir permis d'assister au congrès des neurosciences américaines à la Nouvelle-Orléans, ça restera l'un des meilleurs moments de ma thèse, c'était une véritable aventure linguistique et scientifique et je n'ai qu'une hâte, c'est d'y retourner un jour. J'ai aussi beaucoup apprécié de participer à l'organisation du congrès des Neurosciences françaises, c'est toujours intéressant de voir les coulisses et de mettre la main à la pâte. Bref, merci d'avoir fait de cette thèse un concentré d'expériences scientifiques et humaines enrichissantes.

Je voudrais remercier le Dr. Isabelle Arnal pour m'avoir aiguillée, donné des conseils, pour avoir répondu à mes (nombreuses) questions et d'avoir suivi mon travail de thèse.

Je remercie énormément Sandrine De Seranno. On a construit ce labo ensemble, il s'est passé beaucoup de choses et en faire la liste prendrait trop de temps alors je voudrais sincèrement te remercier. Tu m'as appris beaucoup de choses sur tout. Tu m'as hélas montré un des aspects très difficile de ce métier, tu m'as fait prendre conscience du challenge à venir. Ça ne va pas être de la tarte, mais je vais tenter ma chance. Je retiens surtout les bons moments, comme les succès de manips, les premiers neurones, la Nouvelle-Orléans, les gâteaux du midi, mais surtout du double-zéro (où je me suis fait clairement avoir, faut bien le dire...) et aussi les manips en salle de culture. Bref, un grand grand merci, j'ai beaucoup appris.

Je remercie (beaucoup) Yasmina Saoudi de m'avoir formée sur cette belle machine que le microscope confocal du 3ème (il se reconnaîtra), d'avoir pris le temps de me former aussi sur métamorph, d'avoir toujours été là pour la moindre de mes questions microscopiques. Je t'ai pris de ton temps, et tu me l'as donné gratuitement, sans modération et toujours avec le sourire. Je te remercie aussi de m'avoir fait voyager un peu avec toi durant ces trois ans, c'est toujours un plaisir de parler de ce petit monde microscopique et du monde tout court.

Je remercie aussi Christophe Bosc, le magicien des ordinateurs. Merci de m'avoir initiée à « comment être un bon responsable informatique ». Merci pour tous tes conseils et ta bonne humeur un peu Ch'ti.

Je tiens à remercier toute l'équipe de l'animalerie, qui a fait que tous ces travaux ont pu être réalisés, car il en a fallu du matériel pour tout ça. Merci à Fabien, Laure, Romain, Sylvain et les autres que j'ai oublié.... Merci d'avoir répondu à mes demandes, d'avoir géré et d'avoir allégé un peu mon travail en y participant (merci le passe-plat).

Je voudrais remercier Karine Laulagnier, partenaire d'isofluranerie... merci pour les discussions scientifiques dans les couloirs, autour d'un café et pour tes nombreux conseils. Entre cultivateurs de neurones, on se comprend.

Je remercie Sacnicté, Flavia et Leti. Vous m'avez aidé à avoir un regard neuf sur les choses, merci pour vos conseils (littéraires, culinaires et scientifiques). Grâce à vous, j'ai voyagé très loin, mais dans un seul bâtiment. Avec vous, il y a du soleil tous les jours ! Muchas Gracias !

I want to specially thank Travis, you have been very important in everything in this thesis. You help me to improve my scientific judgment, and my English (which ~~is~~ was very bad). I could list every things you teach me, but I think it would be too long, so I will just say thank you for everything, without you, I don't think I would have been able to do everything I've done. The paper, the experiments, posters, cover letter, applying to post-doctoral position, beers, etc, all these things I thank you for, and also Amanda. You've been very important to me guys, thank you so much. I really enjoyed hiking to lakes and doing rafting with typical French pic-nique with jam-peanuts-butter sandwiches and rosé fresh from the river. I hope next time it will be in Colorado canyon and maybe find LE big nugget!

Je remercie aussi Marine pour avoir partagé mon enthousiasme pour la science et pour les délires en tous genres... parce que l'entraînement, c'est du beurre... Pour ton teint de pêche du matin ! Pour les neurohebdo et neurodocs, dans lesquels tu t'es investie comme une dingue, et au final, on a pu faire des trucs bien sympas.

Je voudrais remercier Eve Borel pour les petits cafés du matin, pour les mutants en mode à l'arrache, pour les oligomères en blind-test, pour la bonne humeur de tous les jours, Merci Eve ! (et désolé de n'avoir jamais eu le temps de t'installer outlook..).

Je remercie mes compagnons de galère, Romain et Hélène, qui comme moi passent, ont passé ou passeront leur thèse cette année, c'était bien sympa de pouvoir un peu décompresser, on se sent un peu moins seul à plusieurs.

Je voudrais remercier la team Neurodocs, particulièrement Charlotte, Marjo, Mélina et Fanny, et bien sur tous les autres. La soirée Filles du Gin en mode Mojito, c'est un bon concept ! Les neurodocs, c'était une bien sympathique expérience, même si j'ai loupé notre super soirée de Noël.... Merci à tous.

Je remercie Fabien Lanté pour m'avoir initiée aux bases de l'électrophysio et surtout de m'avoir donné des supers tranches pour des super manips. Tu m'as donné de bons conseils avé l'accent du Sud ! Ca a apporté du soleil dans l'équipe !

Je voudrais remercier Marc, même si tu m'as tué de nombreux neurones. Merci de m'avoir fait découvrir la crémaillère en mode parquet-sac-poubelle. Je pense que tu mérites ton second nom d'homme-wikipédia. Ces deux ans en ta compagnie à la paillasse c'était quand même bien marrant ! Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Je remercie tous les autres membres de mon équipe (12) pour les manips, pour la science, pour la bonne humeur, pour tous les jours et pour la préparation de mon oral, ainsi que Karine, la gestionnaire qui gère, surtout pour les commandes express !

Je voudrais remercier l'équipe VTT (Benoit, Eric, Bruno, Romain et les autres), c'était bien sympa de décompresser sur deux roues à dos de montagne ! Que de belles descentes !

Je voudrais remercier l'équipe 13, Elea (pour ta SUPER bonne humeur !), Auréliane (co-Tauiste ^^), ainsi que Laurence, Anne (contaminée par tau aussi), Emilie et Ninon. Jour après jour, toujours de la bonne humeur, des conseils, des discussions scientifiques ou pas (surtout culinaire en fait...), bref, merci pour tout ça.

Je voudrais remercier l'équipe 1 et l'équipe 2. On a partagé l'étage et les labos pendant 3 ans, et cela fut vraiment sympathique. Toujours disponibles pour converser sur des sujets scientifiques, des bonnes questions scientifiques à discuter, bref, des bons moments de sciences.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes du Gin, car je ne peux pas toutes les citer, mais vous m'avez tous apporté beaucoup, j'ai passé trois super années en votre compagnie, je garderai un très bon souvenir de Grenoble et du GIN. Merci à tous pour avoir participé à ma formation scientifique et plus encore. Un grand merci à vous tous !

Je voudrais remercier Antoine Leboucher qui a fortement contribué à ce manuscrit en me prodiguant de nombreux conseils et corrections. Sans toi, ça aurait été difficile d'arriver au bout de toutes ces pages. Tu m'as soutenu comme toujours, et pour ça, je te remercie énormément.

Et enfin je remercie les cultivateurs et producteurs de café qui m'ont fourni la dose de caféine et autres antioxydants qui ont été nécessaires à la réalisation de ce projet.

Résumé

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative caractérisée par une perte progressive des fonctions cognitives. Cette perte des fonctions cognitives est directement liée à une atteinte neuronale et plus particulièrement synaptique. Deux caractéristiques histopathologiques en lien avec des dérégulations protéiques sont retrouvés chez les patients atteints de la MA : les plaques séniles extracellulaire composées de peptides β -amyloïdes ($A\beta$) fibrillaire et la dégénérescence neurofibrillaire constituée d'agrégats intracellulaires de protéines tau hyper et anormalement phosphorylées. Les formes agrégées de ces protéines ont longtemps été considérées comme neurotoxiques, cependant, il est maintenant avéré que les formes solubles de ces protéines dérégulées étaient à l'origine de la pathologie. Les synapses excitatrices situées au niveau des épines dendritiques sont les cibles du peptide $A\beta$ sous forme soluble et oligomérique ($A\beta_o$). Ce dernier en altère la fonction et induit leurs pertes. Récemment, il a été montré que cette action synaptotoxique de l' $A\beta_o$ est dépendante de la protéine tau. De plus, dans un autre modèle de tauopathie, la démence fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (FTDP-17), la synaptotoxicité de tau s'est révélée dépendante de son état de phosphorylation. Ainsi, il émerge le concept de tau synaptique dans un contexte pathologique. Cependant, des études plus récentes ont montré que, en condition physiologique, une petite portion de tau se retrouve au niveau de la synapse. Au regard de ces nouvelles données, il est possible que tau, en plus d'être une protéine axonale, nucléaire et membranaire, soit aussi synaptique.

Dans ce contexte, les travaux présentés dans cette thèse visent à étudier l'implication de la protéine tau dans la fonction synaptique et les perturbations induites par la présence d' $A\beta_o$. Ces travaux ont été effectués sur un modèle cellulaire de cultures primaires de neurones corticaux et sur tranche d'hippocampe de souris par des méthodes biochimiques et d'analyse dynamique en microscopie confocale sur cellules vivantes. Afin d'étudier l'impact d'une activation synaptique sur un système de culture neuronal, l'utilisation combinée de la bicuculline, antagoniste des récepteurs gabaergique $GABA_A$ et de 4-amino pyridine, bloqueur de canaux potassiques, permet d'établir une potentialisation à long terme sur les synapses. Grâce à un protocole d'extraction permettant d'isoler le compartiment post-synaptique (fraction contenant la densité post synaptique dont le marqueur protéique PSD-95), nous avons montré que l'activation synaptique enrichie la fraction PSD en protéine tau suggérant son implication dans les phénomènes de plasticité synaptique. L'étude du cytosquelette d'actine prépondérant au niveau synaptique a révélé que l'actine filamenteuse est un partenaire de tau. Dans un contexte pathologique, l'incubation d' $A\beta_o$ induit le recrutement de tau à la synapse et perturbe l'organisation du cytosquelette d'actine. Ce changement structurel du cytosquelette d'actine pourrait être à l'origine des perturbations de la plasticité et du maintien synaptique induit par $A\beta_o$. En conclusion, l'ensemble des résultats de cette thèse suggère que tau exerce une fonction physiologique au sein de la synapse impliquant une interaction avec le cytosquelette d'actine et qu'en conditions pathologiques (induites par $A\beta_o$), on observe une altération fonctionnelle du rôle de tau à la synapse qui pourrait participer aux perturbations cognitives caractéristiques de la MA.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of cognitive functions. This loss of cognitive functions is directly related to neuronal impairment, and more specifically, synaptic dysfunction. Two histopathological features found in AD patients' brains are related to protein deregulation: extracellular neuritic plaques composed of fibrillar β -amyloid peptide ($A\beta$) and intracellular aggregates composed of hyperphosphorylated tau, named neurofibrillary tangles. Aggregated forms of these peptides have been considered neurotoxic, however, it is now recognized that soluble forms of these deregulated proteins are causal to the pathology. Soluble, oligomeric forms of $A\beta$ peptide ($A\beta_o$) target excitatory synapses where they diminish synaptic function and cause loss of dendritic spines. Recently, it has been shown that the $A\beta_o$ synaptotoxicity is tau-dependent. Another tauopathy, fronto-temporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), exhibits synaptotoxicity, which has proved to be dependent on the phosphorylation state of tau. Thus, emerged the concept of synaptic tau in a pathological context. Recent studies have shown that a small quantity of tau is present in synapses under physiological conditions. These new data suggest that tau is a synaptic protein, in addition to being axonal, nuclear and membrane-associated.

In this context, the work presented in this thesis characterizes the involvement of tau in synaptic function and its $A\beta_o$ -induced disturbances. This work was conducted using primary cortical neurons cultured from mice and hippocampus slices and employed biochemical methods and confocal live-cell imaging. To study the impact of a synaptic activation on synaptic tau, we combined bicuculline, an antagonist of GABA_A receptors and 4-amino-pyridine, potassium channel blocker, to establish long-term synaptic potentiation. By isolating the post-synaptic compartment (i.e. the fraction containing the post synaptic density and its marker PSD-95), we have shown that synaptic activation induced an enrichment of tau in PSD. This suggests its involvement in synaptic plasticity. The study of the actin cytoskeleton, which is specifically enriched in dendritic spines, revealed that filamentous actin is a molecular partner of tau, which may provide a means of recruiting tau to the synapse. Turning our attention to a pathological context, exposure to $A\beta_o$ induced tau recruitment to the synapse and disrupts the actin cytoskeleton organization without exogenous synaptic stimulation. This structural modification of the actin cytoskeleton could underlie the disturbance of plasticity and synaptic maintenance induced by $A\beta_o$. In conclusion, this thesis provides evidence that tau performs a physiological synaptic function that involves an interaction with the actin cytoskeleton. Further, the synaptic function of tau is altered in pathological conditions (i.e. exposure to $A\beta_o$), and may contribute to the cognitive disturbances in AD.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer	2
1. Le vieillissement Mondial.....	2
2. La démence	2
2.1.Définition.....	2
2.2.La Maladie d'Alzheimer	2
2.3.Quelques chiffres.....	3
3. Facteurs de risques.....	3
3.1.Les facteurs génétiques.....	3
3.1.1. L'apolipoprotéine E (APOE).....	4
3.1.2. Bin-1.....	4
3.2.Les facteurs de risques liés à l'environnement.....	4
3.3.Les facteurs protecteurs.....	5
4. La Maladie d'Alzheimer	5
4.1.Les débuts.....	5
4.2.Physiopathologie.....	6
4.3.Lésions amyloïdes.....	7
4.3.1. Le peptide β -amyloïde.....	7
4.3.2. Genèse du peptide.....	8
4.3.3. Les mutations.....	9
4.3.4. Formation des oligomères et fibrilles d'A β	9
4.3.5. L'A β extra et intracellulaire.....	10
4.4.La dégénérescence neurofibrillaire (DNF).....	12
Chapitre 2 : La synapse	13
1. Les différentes synapses.....	13
2. Les épines dendritiques.....	14
3. La synapse glutamatergique.....	15
4. La densité post-synaptique.....	16
4.1.Composition de la PSD.....	16
5. L'actine synaptique.....	17
5.1.Généralités.....	17

5.2. Un cytosquelette dynamique.....	18
5.3. Réorganisation récepteurs dépendante.....	20
6. Les récepteurs glutamatergiques.....	20
6.1. Les récepteurs AMPA.....	21
6.1.1. Structure et composition.....	21
6.1.2. Trafic des R-AMPA.....	21
6.2. Les R-NMDA.....	23
6.2.1. Structure et composition.....	23
6.2.2. Localisation synaptique et extra-synaptique.....	24
6.3. Les partenaires des récepteurs NMDA et AMPA.....	24
6.3.1. PSD-95.....	24
6.3.2. Fyn.....	25
7. La potentialisation à long terme.....	25
7.1. Découverte de la LTP.....	25
7.2. Cascades d'évènements moléculaires lors de la LTP.....	27
Chapitre 3 : La protéine tau.....	30
1. Isoformes et épissage.....	30
2. Modifications post-traductionnelles de tau.....	32
2.1. La phosphorylation.....	32
3. Les partenaires de tau.....	33
3.1. Les microtubules.....	34
3.2. L'actine.....	34
3.3. Fyn.....	34
4. Fonctions synaptiques de tau.....	35
5. Les KO tau.....	36
Chapitre 4 : La synaptotoxicité de tau.....	38
1. La synaptotoxicité de l'A β	38
2. Les modèles de synaptotoxicité de tau.....	39
2.1. La souris P301L.....	39
2.2. Propagation trans-synaptique de tau.....	40
3. La souris APP.....	41
Objectifs.....	44
Partie 1 : La dynamique de tau dans la synapse et sa perturbation par les oligomères d'Aβ.....	45

1. Objectif.....	45
2. Résultats.....	46
3. Conclusion et illustration du modèle.....	74
Partie 2 : Perturbation de la plasticité synaptique et du cytosquelette d'actine par les oligomères d'Aβ.....	78
1. Objectif.....	78
2. Résultats.....	79
3. Conclusion.....	113
Discussion générale.....	115
Bibliographie.....	119

Abréviations

ADAM : A disintegrin and metalloproteinase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : Adénosine di-phosphate

AMP : Adénosine monophosphate

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate

APH-1 : Anterior pharynx-defective 1

APOE : Apolipoprotéine E

APP : Amyloid precursor protein / protéine précurseur du peptide β -amyloïde

ARN : Acide ribo-nucléique

ATP : Adenosine tri-phosphate

A β : Peptide β -amyloïde

A β _o : Peptide β -amyloïde oligomérique

BACE-1: β -site APP-cleaving enzyme 1

BDNF : Brain derived neurotrophic factor

CA1 : Région de la corne d'Ammon 1

CA3 : Région de la corne d'Ammon 3

CaMKII : Calcium/calmoduline kinase dépendante 2

C-ter : C-terminale

DNF : Dégénérescence neurofibrillaire

DYRK1-A : Dual specific tyrosine regulated kinase 1A

FRAP : Fluorescence recovery after photobleaching / Recouvrement de la fluorescence après photo-blanchiment

FTDP-17 : Fronto-temporal dementia associated and Parkinsonism linked to chromosome 17/ démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17

GFP : Green fluorescent protein

GSK3 β : Glycogène synthase kinase-3 β

KO : Knock-out

LTD : Long term depression / dépression à long terme

LTP : Long term potentiation / potentialisation à long terme

MA : Maladie d'Alzheimer

MAPT : Microtubule associated protein tau

MARK : Microtubule-affinity-regulating kinase A

MBD : Microtubule binding domain / Domaine d'interaction avec les microtubules
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
Non-PDPK : Non-Proline directed Protein Kinase
N-ter : N-terminal
PA-GFP : Photo Activatable Green Fluorescent Protein / protéine fluorescente verte photoactivable
PDPK : Proline directed Protein Kinase
PEN-2 : Presenilin enhancer-2
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PP2A : Protéine Phosphatase 2A
PP2B : Protéine Phosphatase 2B
PP5 : Protéine Phosphatase 5
PRD : Proline Rich Domain / Domaine riche en proline
PS1/PS2 : préséniline 1/2
PSD : Post Synaptic Density / Densité post-synaptique
R-AMPA : Récepteurs AMPA
R-NMDA : Récepteurs NMDA
Ser : Sérine
Tau : Tubulin associated unit / unité associée à la tubuline
Thr : Thréonine

Introduction

La mémoire est la capacité de l'esprit à pouvoir stocker, conserver et rappeler les souvenirs ou les gestes. Elle est fondamentale dans notre vie de tous les jours et nous l'utilisons constamment, pour tout et tout le temps. Le cerveau et les cellules qui le constituent participent au bon fonctionnement des processus à la base de la formation de cette mémoire. C'est la communication de neurone à neurone qui en constitue le substrat élémentaire, à l'origine des processus de création, modification et élimination des souvenirs. Au sein de la synapse, lieu de transfert de l'information entre les neurones, des interactions d'acteurs moléculaires permettent aux souvenirs de se former, de se renforcer ou bien d'être oubliés. Dans la maladie d'Alzheimer, les synapses sont parmi les premières structures affectées. Il est donc primordial, au vu de l'impact qu'a la maladie d'Alzheimer dans la société actuelle, de comprendre comment ces synapses sont affectées et quels mécanismes sous-jacents sont responsables des altérations de cette mémoire moléculaire.

Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer

1. Le vieillissement mondial

Le vieillissement de la population devient un phénomène mondial. En 1990, 26 pays avaient une population constituée de plus de deux millions de citoyens de 65 ans et plus, et 34 pays de plus allaient se joindre à cette liste en 2030. En l'an 2000, le nombre de personne âgées (65 ans et +) dans le monde fut estimé à 420 millions et serait de un milliard en 2030. Les pays en développement montrent déjà une large augmentation de la population vieillissante. Ce phénomène de vieillissement de la population est un processus appelé « transition démographique » dans lequel la mortalité et la fertilité déclinent.

Ainsi, les pays développés et en développement font face à l'émergence de pathologies caractéristiques des sociétés vieillissantes, comme les démences. Ces pathologies affectent la capacité des personnes âgées à vivre normalement au sein d'une communauté et cela pose la question de leur prise en charge, d'un point de vue tant humain qu'économique. Ces questions de santé publique vont dans les années à venir considérablement affecter la société telle qu'elle est connue actuellement. De par leur ampleur et leur coût, les démences représentent donc un véritable défi économique, social et médical.

2. La démence

2.1. Définition

La démence est définie comme un syndrome clinique caractérisé par de multiples déficits cognitifs sévères affectant la capacité des personnes à effectuer des tâches de la vie quotidienne, incluant les interactions sociales et professionnelles. Les déficits cognitifs incluent aussi l'altération de la mémoire mais aussi l'aphasie, l'apraxie ou les fonctions exécutives.

2.2. La Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est à l'origine de la majorité des démences rencontrées chez les personnes âgées, soit entre 60 et 70 % des cas. Le diagnostic de maladie d'Alzheimer (MA) est déterminé par la présence de deux marques histopathologiques caractéristiques : la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles toutes deux retrouvées dans le cerveau

des patients atteints de cette maladie. La MA débute le plus souvent par des problèmes de mémoire qui sont invariablement suivis par la globalisation des déficits cognitifs et s'en suit le décès de la personne.

2.3. Quelques chiffres

Bien qu'identifiée il y a de cela un siècle environ, la recherche sur les symptômes, les causes, les facteurs de risques et des potentiels traitements ont émergés durant les 30 dernières années. Bien que les avancées sur la MA soient importantes, les changements biologiques à l'origine du développement de la MA restent encore mal connus, à l'exception des formes dites « familiales » de la MA dues à l'héritage de mutations génétiques.

D'après le World Alzheimer Report 2013, il a été estimé à 35 millions le nombre de personnes atteintes de démences dans le monde, nombre qui sera doublé d'ici 2040 et puis triplé en 2050. Environ 70% de ces cas seront attribués à la MA.

3. Facteurs de risques

La MA est une pathologie multifactorielle influencée par des facteurs environnementaux et génétiques. L'âge est le facteur le plus déterminant dans le développement de la MA, et la mutation de certains gènes contribuent à une petite portion de cas. L'association de la MA avec l'âge peut aussi refléter partiellement l'effet cumulatif de facteurs de risques et de facteurs protecteurs accumulés durant la vie. Cet effet serait alors le résultat des interactions entre facteurs génétiques et les facteurs psychologiques, biologiques et environnementaux rencontrés durant l'expérience de vie. La recherche sur l'épidémiologie, la neuro-imagerie et la neuropathologie de la MA ont rapporté l'implication de facteurs génétiques, mais également biologiques ou environnementaux dans le développement de la pathologie. De plus en plus de preuves impliquent l'impact de la santé métabolique, de l'activité professionnelle et de l'inflammation.

3.1. Les facteurs génétiques

Posséder une mutation sur l'un des gènes du précurseur de la protéine amyloïde (APP : amyloid precursor protein), ou de la préséniline-1 et 2 est suffisant pour développer la forme familiale de la MA. Ces trois gènes codent pour des enzymes impliquées dans la genèse des peptides β -amyloïdes ($A\beta$), retrouvés agrégés dans le cerveau des patients et présentant une

synaptotoxicité. Par exemple, sur les 30 mutations observées sur le gène APP, 25 sont pathogéniques menant à une surproduction d'Aβ. Ces mutations représentent seulement 1 à 5% des cas de MA. La majorité des cas de MA est d'origine sporadique avec une large hétérogénéité des profils de facteurs de risques génétiques ou non. Plusieurs facteurs ont ainsi été identifiés comme facilitant le développement de la MA.

3.1.1. L'apolipoprotéine E (APOE)

L'allèle ε4 de l'APOE a été établi comme la version du gène la plus susceptible d'être reliée aux formes précoce et tardive de la MA sans pour autant être nécessaire ou suffisante au développement de la pathologie. Cet allèle constitue l'un des trois allèles existant pour la protéine APOE (ε2, ε3 et ε4), et deux copies de l'allèle ε4 augmente de 10 fois le risque de développer une MA par rapport à un doublet allélique ε3. L'allèle APOE ε2 quant à lui a été montré plutôt protecteur (Corder *et al.*, 1994 ; Genin *et al.*, 2011). Le gène APOE code pour une protéine essentielle dans le métabolisme des lipides et dans la clairance hépatique de l'Aβ (Neil et Kline, 2012).

3.1.2. Bin-1

Un allèle présent en amont de BIN-1 augmentant l'expression de ce dernier a été établi comme le deuxième facteur génétique impliqué dans le développement de la MA. Bin-1 est une protéine associée à de nombreux processus cellulaires dont l'endocytose et la régulation de la dynamique du cytosquelette. De plus, Bin-1 interagit avec tau et pourrait être le premier facteur de risque génétique associé à la pathologie tau (Dolan et Johnson, 2010).

3.2. Les facteurs de risques liés à l'environnement

L'hypertension, la consommation d'alcool, la cigarette et le régime alimentaire constituent des facteurs environnementaux déterminants dans le risque de développer la MA, ainsi que l'exposition à des traumatismes crâniens et des traitements post-ménopause. De plus, le contexte social est lui aussi déterminant puisque le statut économique, l'éducation, l'activité physique et la dépression sont aussi des paramètres susceptibles de moduler le risque de développement de la MA. (Cummings 2008 ; Barnes *et al.*, 2011).

Tableau 1: Facteurs de risques et facteurs protecteurs de la maladie d'Alzheimer

Classe de facteurs	Facteurs de risque	Facteurs protecteurs
Métaboliques et nutritionnels	Obésité, diabète, hypertension, hypercholestérolémie	Exercice physique, Acides gras oméga-3, Vitamines E, C, B6, B12, B9, statines, consommation modérée d'alcool, Café/thé
Génétiques	APOEε4/ε4, historique familial de démence	APOEε2/ε2, mutation APP A673T
Sociaux	Vieillesse, stress psychologique, dépression	Activité cognitive, professionnelle, Niveau d'études
Autres	Traumatisme crânien	Agents anti-inflammatoires non stéroïdiens

3.3. Facteurs protecteurs

Il existe des facteurs protecteurs liés à l'environnement, comme l'exercice physique ou l'utilisation d'agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens (voir tableau 1) et liés à des facteurs génétiques comme la version d'APOE. Récemment, une découverte sur l'étude de 1795 islandais a révélé que la présence de la version A673T d'APP constitue un facteur non seulement protecteur contre la MA mais aussi dans le vieillissement suggérant une implication de l'Aβ dans ce processus. Il a été montré que cette version du gène induit au niveau protéique une forte diminution (40%) de la production du peptide Aβ par réduction du clivage par la β-sécrétase BACE-1 en affectant son site de clivage (Jonsson *et al.*, 2012).

Ainsi, la maladie d'Alzheimer est une maladie complexe car malgré de nombreux facteurs de risques identifiés, l'origine du développement de cette pathologie reste encore obscure, et constitue actuellement un vrai défi pour la recherche scientifique.

4. La maladie d'Alzheimer

4.1. Les débuts

La maladie d'Alzheimer fut identifiée pour la première fois il y a environ un siècle par le praticien allemand Alois Alzheimer (Figure 1). Il examina une patiente de 51 ans du nom d'Auguste D. (Dieter) en 1901 (Graeber 2004). Son mari nota un changement soudain dans son comportement, dominé par la panique, la terreur et la suspicion que son mari ait une liaison avec une voisine. Elle devint négligente et très agitée au fil des mois. Elle fut internée à l'hôpital dont elle ne ressortit jamais. Elle souffrait alors d'altération de la mémoire, d'agitation, d'insomnie et se sentait constamment victime de persécution. Elle était incapable de réaliser des tâches manuelles aussi bien que mental. Ses rares périodes de calme étaient alternées par

des phases d'extrême agressivité (Page et Fletcher 2006). C'est ainsi que le premier cas de maladie d'Alzheimer fut rapporté et présenté par Alzheimer lui-même en 1906. C'est en 1911 qu'il publia alors une revue afin d'expliquer et de discuter des différents aspects de la pathologie. Il fut l'un des premiers à décrire la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles à partir de l'étude du cerveau d'Auguste D (Alzheimer 1911), Fisher et Hübner firent aussi ces mêmes observation (Goedert, 2009) sur leurs patients durant la même période. Cependant, c'est plus tard que ces manifestations histologiques leur furent données les noms de DNF et plaques séniles (Graeber *et al.*, 1999).



Figure 1: *Portrait d'Alois Alzheimer (Graeber 2004).*

4.2. Physiopathologie

La maladie d'Alzheimer présente des caractéristiques biologiques spécifiques. En plus d'une atrophie cérébrale (Figure 2A), c'est-à-dire un rétrécissement du volume de l'encéphale, deux lésions histopathologiques sont retrouvées de façon systématique: la dégénérescence neurofibrillaire constituées de protéines tau hyper et anormalement phosphorylées enchevêtrées et les plaques séniles, agrégats composés de fibrilles de peptide β -amyloïde (Figure 2B).

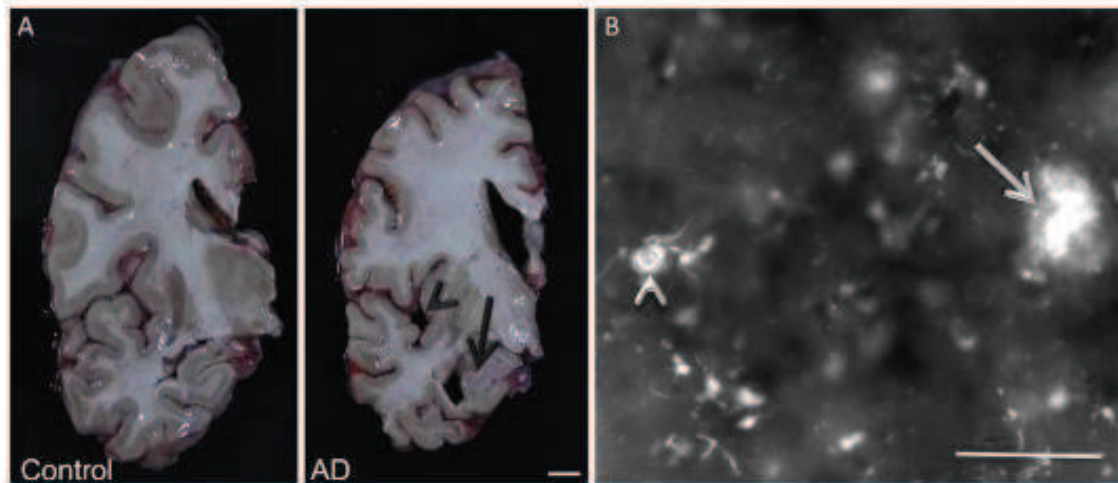


Figure 2 : Caractéristiques anatomo-pathologiques de la maladie d'Alzheimer. Les cerveaux des patients atteints de MA présentent une atrophie générale et particulièrement de l'hippocampe (flèche en A) et un amincissement cortical (tête de flèche en A) (patient sain = Control, AD = atteint de MA). A l'échelle microscopique, la MA se définit par la présence de plaques séniles (flèche en B) et de dégénérescence neurofibrillaire (tête de flèche en B). Marquage à la thioflavine S. Barres d'échelle A: 1 cm, B: 20 μ m. Extrait de Crimins *et al.*, 2013.

4.3. Lésions amyloïdes

Les plaques séniles sont constituées principalement de peptide β -amyloïde ($A\beta$) assemblés en fibrilles agrégés dans le compartiment extracellulaire. Les fibrilles d' $A\beta$ ont longtemps été considérés comme la source de la neurodégénérescence dans la MA (Hardy et Higgins, 1992) mais l'apparition des plaques séniles ne corrélaient pas ou peu avec la mort neuronale, la perte synaptique et les déficits cognitifs (Tardy *et al.*, 1999). En revanche, la présence d'oligomères de peptide β -amyloïde ($A\beta_o$) solubles coïncidaient avec la perte synaptique et la sévérité des atteintes cognitives (Haass et Selkoe, 2007).

4.3.1. Le peptide β -Amyloïde

Le peptide Amyloïde est constitué de 39 à 43 acides aminés de 4 kDa et est issu du clivage de la protéine transmembranaire APP (amyloid precursor protein) de 695-770 acides aminés située sur la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, les membranes lysosomales, endosomales et mitochondriales. Le clivage de la protéine APP peut suivre deux voies protéolytiques différentes : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique, cette dernière conduisant à la production d' $A\beta$ (Figure 3).

Non-amyloïdogénique

Amyloïdogénique

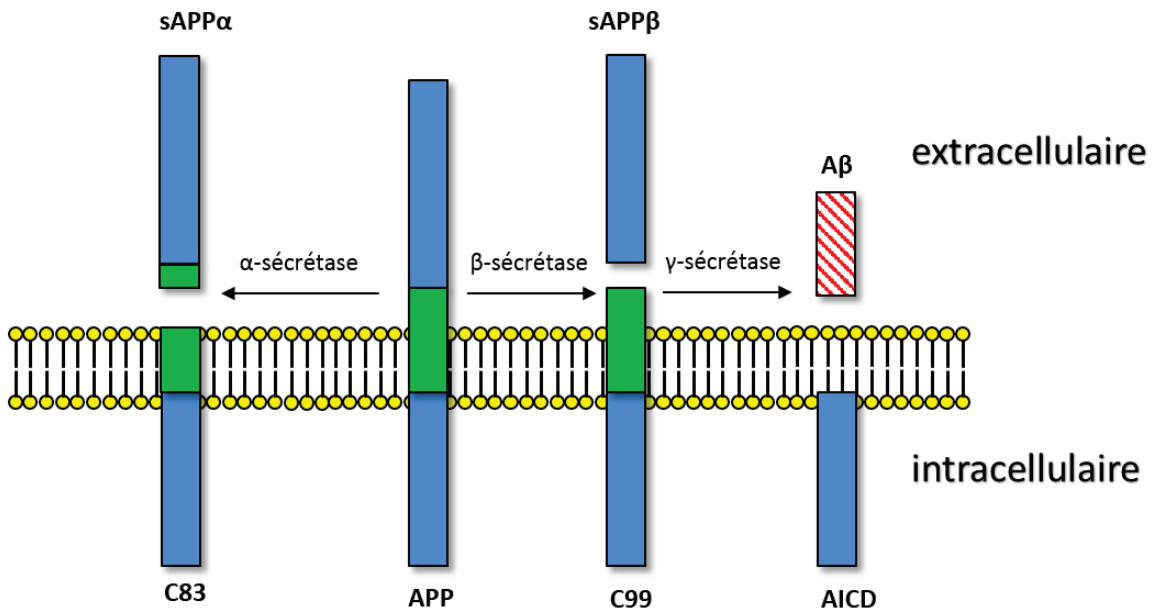


Figure 3: Protéolyse d'APP: le peptide beta amyloïde est un dérivé du clivage d'une protéine plus importante appelée protéine précurseur du peptide amyloïde (APP). APP peut suivre deux voies protéolytiques: les voies **non-amyloïdogénique** et **amyloïdogénique**. La plupart des protéines APP subissent un clivage non-amyloïdogénique régulé par l'α-sécrétase appartenant à la famille des ADAM. Le clivage d'APP par l'α-sécrétase s'effectue à l'intérieur du domaine Aβ empêchant ainsi la genèse du peptide du même nom. Deux fragments sont générés : sAPPα et un petit fragment carboxy-terminal (C83). La γ-sécrétase peut aussi cliver le C83 pour donner un fragment P3 non montré ici. L'APP non clivé par la voie non-amyloïdogénique passe par la voie amyloïdogénique où il devient substrat de la β-sécrétase (β-site APP-cleaving enzyme BACE1) générant le fragment sAPPβ laissant le fragment C99 à la membrane. Ce dernier est alors clivé en N-terminal en fragment de 38-43 acides aminés et produit le peptide Aβ par le complexe γ-sécrétase. Ce clivage conduit à la production d'Aβ1-40 et d'Aβ1-42 suivant un ratio de 10 pour 1 (figure inspiré de LaFerla et al., 2007).

4.3.2. Genèse du peptide

Le clivage de l'APP est régi par plusieurs enzymes ou complexe enzymatique. Trois enzymes avec une activité α-sécrétase ont été identifiées, appartenant à la famille ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) soit ADAM 9,10 et 17. La β-sécrétase (BACE1, β-site APP-cleaving enzyme 1) a été identifiée comme l'enzyme amorçant la première étape de la genèse de l'Aβ. Enfin la γ-sécrétase, complexe enzymatique constitué de la préséniline 1 (PS1) ou 2 (PS2), la nicastrine, APH-1 (anterior pharynx-defective 1) et PEN-2 (presenilin enhancer-2). La voie amyloïdogénique conduit à la formation du peptide β-amyloïde à partir du clivage de l'APP par la β-sécrétase puis par la γ-sécrétase. Les formes générées sont alors distinguées entre Aβ1-

40 et A β -1-42. Plus récemment, d'autres formes intermédiaires ont été identifiées (*Takami et al.*, 2009) et auraient une incidence sur le potentiel d'agrégation et de toxicité des peptides A β (*Vandersteen et al.*, 2012). Dans la MA, la genèse de peptide A β est augmentée par une sur-activation de la voie amyloïdogénétique, et dans certains cas, elle est due à des mutations affectant les acteurs de cette synthèse.

4.3.3. Les mutations

Les mutations situées sur les gènes APP, PS1 et PS2 sont la cause des formes autosomales dominantes de la MA dans les formes précoces de la maladie. La mutation de ces gènes affecte le métabolisme et la stabilité de l'A β . Une des mutations les plus connues est la mutation Swedish (APPSwe) où un double changement d'acide aminé conduit à l'augmentation du clivage d'APP par la β -sécrétase (*Haass et al.*, 1995). La mutation Arctic (APP Arc) augmente l'agrégation d'A β conduisant à une forme précoce et agressive de la maladie. Les mutations sur les enzymes participant au clivage de l'APP, les présénilines sont aussi mutées dans certaines formes de MA. La mutation PS1 M146V par exemple augmente le niveau d'A β 1-42 au détriment de l'A β 1-40, moins prompt à l'agrégation. Ces mutations conduisent à une production anormale de peptide A β , qui va alors s'assembler en oligomères et acquérir un gain de fonction toxique (*LaFerla et al.*, 2007).

4.3.4. Formation des oligomères et fibrilles d'A β

L'A β existe sous plusieurs formes assemblées, les monomères, les oligomères, les proto-fibrilles et les fibrilles (Figure 4). La formation des fibrilles est un processus complexe et dépendant de la nucléation des peptides. Les mécanismes conduisant à cette formation restent encore peu connus mais seraient dû à l'arrangement structural de la protéine. Les formes oligomériques, comprises entre 10 et 100 kDa, sont décrites comme étant les formes les plus toxiques (*Lambert et al.*, 1998 ; *Haass et Selkoe*, 2007 ; *Tomiyama et al.*, 2010). Il a été mis en évidence que des oligomères d'origine synthétique présentent une toxicité analogue à celle des oligomères naturels, fournissant ainsi un modèle de choix dans l'étude de l'assemblage et de la toxicité du peptide A β et de ses formes oligomériques (*Snyder et al.*, 1994).

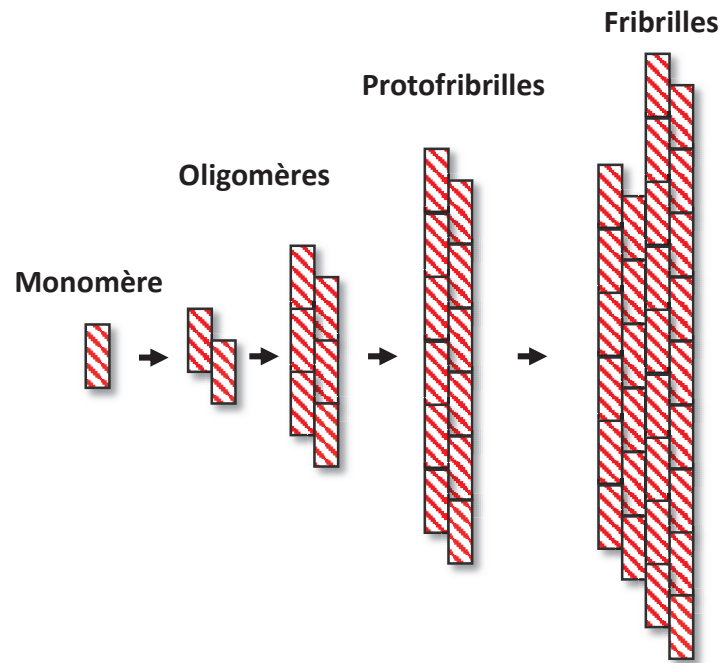


Figure 4: Le peptide β -amyloïde existe sous plusieurs formes dans la MA : monomérique, oligomérique, protofibrillaire et fibrillaire (inspiré de LaFerla *et al.*, 2007).

4.3.5. L'A β extra et intracellulaire

Bien que le peptide A β fût identifié comme un composé des plaques amyloïdes extracellulaires dans le milieu des années 1980, peu après, des études ont montré l'existence intracellulaire de ce peptide. La première étude fut basée sur l'utilisation d'un anticorps dirigé contre les résidus 17 à 24 de l'A β . L'immuno-réactivité a été mise en évidence dans le cerveau de patients avec ou sans MA (Grundke-Iqbal *et al.*, 1989 ; Gyure *et al.*, 2001). Par ailleurs, des études plus récentes basées sur des modèles expérimentaux ont montré qu'une accumulation d'A β intracellulaire serait un événement antérieur à la formation des plaques séniles dans la pathogenèse de la MA, suggérant ainsi que les formes oligomériques d'A β pourraient être responsables des événements précoces de la MA. Plusieurs études sur des modèles transgéniques portant des mutations de l'APP combinés avec des mutations de la protéine tau ont montré que l'accumulation intraneuronale de peptide A β coïncidait avec le dysfonctionnement synaptique ainsi que les altérations de la mémoire dépendantes de l'hippocampe, structure cérébrale impliquée dans la mémoire à court terme (Billings *et al.*, 2005 ; LaFerla *et al.*, 2007). La production intracellulaire de l'A β serait due principalement à la présence de l'APP sur les membranes des organites neuronaux, cependant, il ne représenterait qu'une petite partie de l'A β produit. La majorité de l'A β intracellulaire provient d'une production extracellulaire via l'APP des membranes plasmiques. Sa production et son

internalisation peuvent être régulées par son interaction avec des récepteurs et transporteurs (voir tableau 2).

Tableau 2 : Récepteurs et transporteurs membranaires de l'A β .

Récepteurs-Transporteurs	interactions	Interaction avec A β	Références
Récepteur nicotinique $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChR$)	directe	Induit l'internalisation du récepteur et l'accumulation d'A β intracellulaire et induit l'endocytose des récepteurs NMDA	Wang et al., 2000; Nagele et al., 2002; Snyder et al., 2005
Récepteur lié aux lipoprotéine (LRP1)	directe/ via apoE, $\alpha 2N$, lactoferrin	S'endocyte rapidement avec A β augmentant la production intracellulaire	Bu et al., 2006
Récepteur produits terminaux avancés de glycation (RAGE)	directe	Internalise A β induisant un stress oxydatif et l'activation de la voie NF- κB /transporte l'A β au travers de la barrière hémato-encéphalique	Deane et al., 2003 ; Kim et al., 2013
Récepteur de la protéine du Prion (PrP)	directe	Se lie à PrP au niveau des radeaux lipidiques et active Fyn (Src kinase)	Um et al., 2013; Rushworth et al., 2013
Intégrine	directe	Se lie aux intégrine permettant sa protéolyse extracellulaire	Bi et al., 2002
MEGF10	non renseignée	Induit l'endocytose d'A β dans les radeaux lipidiques	Singh et al., 2010
Récepteurs NMDA	directe	Induit l'endocytose des récepteurs NMDA	Lacor et al., 2007; Texido et al., 2011
Récepteurs AMPA	directe	Interagit principalement avec la sous-unité GluR2/ induit l'endocytose des récepteurs	Hsieh et al., 2006; Zhao et al., 2010
ApoE	directe	Endocyté avec A β via LRP1	Stratman et al., 2005; Bu et al., 2006
RAP	directe	Endocyté avec A β via LRP1	Kanekiyo et Bu., 2009

Plusieurs récepteurs post-synaptiques comme les récepteurs cholinergiques nicotiques $\alpha 7nAChR$, les récepteurs ionotropiques glutamatergiques R-NMDA et R-AMPA peuvent interagir avec l'A β (Dinamarca *et al.*, 2012). Leurs fonctionnements en est altéré résultant une perturbation synaptique. Ces récepteurs interagissent avec les formes oligomériques d'A β et non les formes fibrillaires (Nimmrich *et al.*, 2008). Aujourd'hui, il est bien établi que l'A β est l'un des acteurs de l'altération synaptique menant à la dysfonction neuronale et à l'altération de la mémoire. Cependant, il n'agit pas seul, une autre protéine a été illustrée comme complice de l'action d'A β , et plus particulièrement à la synapse : la protéine tau, qui est aussi retrouvée sous forme d'agrégats, mais cette fois-ci intracellulaire : la dégénérescence neurofibrillaire.

4.4. La dégénérescence Neurofibrillaire (DNF)

C'est dans les années 1960 que la structure des DNF fut identifiée par microscopie électronique sur des coupes de cerveaux de patients atteints de MA (Kidd 1963,1964). La composition moléculaire de ces structures fut découverte plus tard dans les années 1980, à l'aide d'outils immunologiques, et mirent en évidence la présence de neurofilaments (Miller *et al.*, 1986), de la vimentin (Yen *et al.*, 1983), la protéine d'association aux microtubule 2 (MAP2, Nukina et Ihara 1983) et la protéine d'association aux microtubule Tau (Brion *et al.*, 1985 ; Delacourte et Défossez 1986, Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). De plus, le séquençage de protéines extraites du cœur des DNF aboutit à l'identification d'ADNc codant pour la protéine Tau apportant une preuve supplémentaire que Tau compose majoritairement la DNF (Goedert *et al.*, 1988). Cette DNF n'est pas seulement retrouvée dans la maladie d'Alzheimer, mais aussi dans d'autres pathologies neurodégénératives nommées Tauopathies (Sergeant *et al.*, 2008). On retrouve parmi ces pathologies la MA, mais aussi le syndrome de Down, la maladie de Niemann-Pick de type C et aussi la démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (FTDP-17) (Buée *et al.*, 2000). L'apparition de la dégénérescence neurofibrillaire, contrairement aux plaques séniles, suit l'évolution de la pathologie (Braak et Braak, 1991). Ils initient cette théorie qui sera confirmée un peu plus tard par Delacourte et collaborateur en 1999 avec une étude portée sur l'analyse de cerveaux de patients non déments (60) et déments (70) (Delacourte *et al.*, 1999). Bien que corrélées à l'évolution de la MA, au même titre que les plaques séniles, les DNF ne seraient pas à l'origine des dysfonctionnements neuronaux, ce serait plutôt les formes solubles de protéines tau qui les composent, sous forme anormalement modifiées (Feuillette *et al.*, 2010, Flunkert *et al.*, 2012). Ces modifications confèrent aux formes solubles un gain de fonction toxique notamment par des modifications post-traductionnelles tels que les phosphorylations. Celles-ci seraient dues à une altération de la signalisation cellulaire, impliquant de nombreuses kinases, en partie provoquée par la pathologie amyloïde (Ittner et Götz, 2010, Thornton *et al.*, 2011). Il est donc désormais établi que les pathologies tau et amyloïde sont liées et que leurs actions conjointes sont à l'origine des événements précoces de la MA, y compris la perte synaptique.

Chapitre 2 : La synapse

Les synapses forment le lieu de communication entre deux neurones. Elles sont composées de deux compartiments : le pré et le post-synaptique. La pré-synapse est située au niveau de la terminaison axonale du neurone émetteur et la post-synapse est située dans une structure appelée épine dendritique sur le neurone receveur. Les épines dendritiques sont donc représentatives des connexions excitatrices que le neurone fait avec d'autres neurones.

1. Les différentes synapses

Les synapses peuvent être de deux natures. Elles peuvent être électriques, c'est-à-dire que la communication se fait par échange d'ions et le passage du courant se fait donc directement, mais ce type de synapse est minoritaire au sein du système nerveux central des vertébrés. Elles peuvent être chimiques, où interviennent des messagers appelés neurotransmetteurs et le passage du courant est indirect. Ces synapses représentent la majorité de la neurotransmission. Ainsi, le neurone émetteur du message va communiquer via la pré-synapse, c'est par ce compartiment que les neurotransmetteurs vont être libérés. Ensuite, le neurone receveur va récupérer ce message par la post-synapse grâce des protéines que l'on appelle récepteurs qui vont lier les neurotransmetteurs libérés permettant l'ouverture des canaux ioniques post-synaptiques (Figure 4). L'efficacité de la post-synapse à répondre au message pré-synaptique constitue la force synaptique.

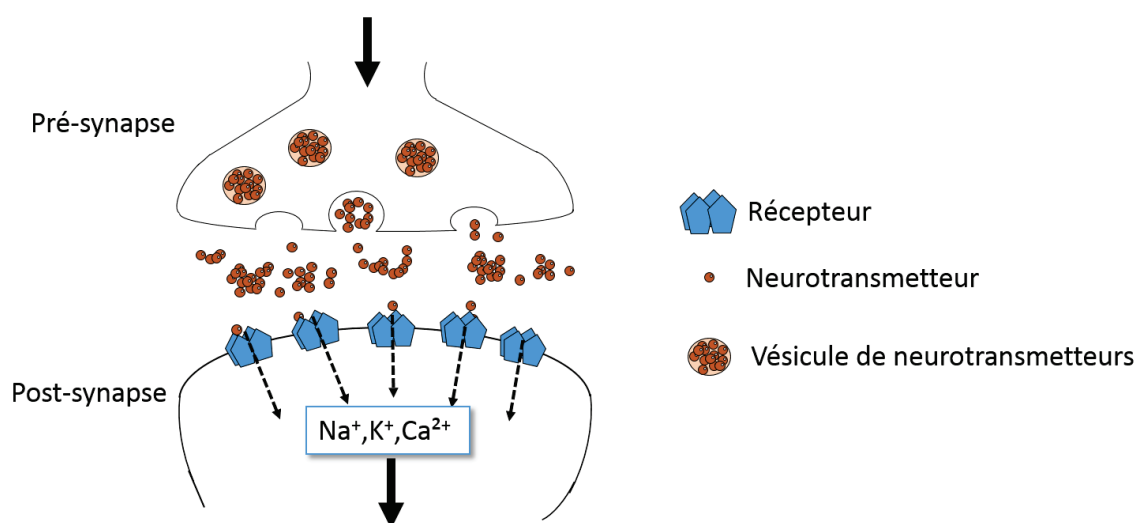


Figure 4 : Schéma simplifié d'une synapse chimique. Un message d'origine électrique arrive au niveau pré-synaptique (flèche noire) et déclenche la fusion des vésicules de

neurotransmetteurs à la synapse. Les neurotransmetteurs vont se lier aux récepteurs post-synaptiques induisant l'ouverture de canaux perméables aux ions. L'entrée d'ions dans le compartiment postsynaptique va provoquer une dépolarisation membranaire, permettant la transmission du message électrique.

Ces synapses ont la propriété d'être plastique, c'est-à-dire qu'elles s'adaptent et leur force et morphologie vont changer selon de l'usage qui en est fait, on appelle ce phénomène la plasticité synaptique.

2. Les épines dendritiques

Les épines dendritiques sont de petites protrusions membranaires recevant l'influx d'un seul terminal pré-synaptique, permettant la régulation de la force synaptique par une seule et même afférence pré-synaptique excitatrice. Ces épines sont des structures très hétérogènes et très dynamiques, particulièrement durant le développement. Leur nombre, taille et forme diffèrent selon les changements intrinsèques ou extrinsèques qui s'opèrent au neurone. Ces changements peuvent être liés à des améliorations ou à des altérations de la force synaptique. L'activité neuronale va conditionner l'apparition ou la disparition des épines dendritiques (Nägerl *et al.*, 2004). La densité moyenne des épines est généralement comprise entre 1 et 10 épines par micromètre de dendrite. Les épines dendritiques sont des structures constituées de trois compartiments distincts : la base effectue la jonction dendrite-synapse, la tête post-synaptique est large et fait contact avec la pré-synapse, bouton terminal de l'axone du neurone émetteur. Enfin, le cou, étroit, relie ces deux structures (Figure 5).

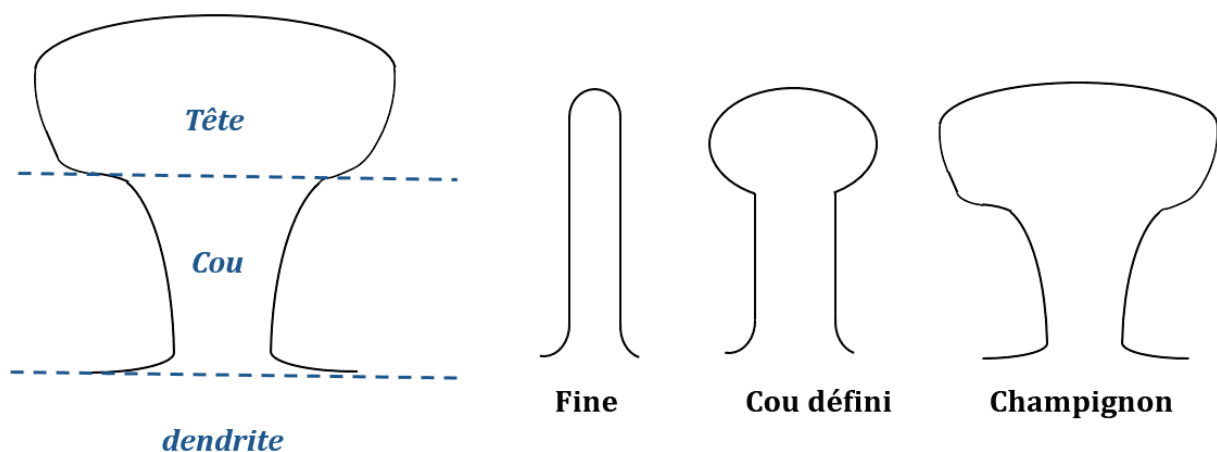


Figure 5 : Schéma d'une épine dendritique et des différents types d'épines.

Les épines sont de tailles et de formes variées, avec, respectivement 0,2 à 2 μm de dimension et un volume de 0,001 à 1 μm^3 . Des études en microscopie électronique ont identifié trois types d'épines classées selon leur morphologie : celles en forme de filopode aussi appelé « thin », les petites épines avec un cou bien défini aussi appelé « stubby » et enfin les épines avec une large tête en champignon « mushrooms spines » (Figure 5).

3. La synapse glutamatergique

Il existe différents types de neurotransmetteurs et donc différents types de synapses.

Tableau 3 : Les différents types de neurotransmetteurs et leur effet post-synaptique le plus commun.

Neurotransmetteurs	Effet post-synaptique le plus courant
Acétylcholine (ACh)	Excitateur
Glutamate	Excitateur
Acide γ -aminobutyrique (GABA)	Inhibiteur
Glycine	Inhibiteur
Catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine)	Excitateur
Sérotonine (5-HT)	Excitateur
Histamine	Excitateur
Adénosine triphosphate (ATP)	Excitateur
Neuropeptides	Excitateur et inhibiteur
Endocannabinoïdes	Inhibent l'inhibition
Monoxyde d'azote (NO)	Excitateur et inhibiteur

Les synapses glutamatergiques représentent la majorité de la neurotransmission excitatrice au niveau cérébral. Une centaine de protéines localisées au niveau de l'épine ont été identifiées à ce jour (Sheng et Hoogenraad, 2007). Elles agissent de concert afin de permettre une bonne transmission de l'information nerveuse émanant des extrémités pré-synaptiques. Parmi ces protéines, on retrouve des éléments du cytosquelette comme l'actine et la tubuline, des protéines comme les récepteurs NMDA et AMPA, des protéines d'ancrage comme PSD-95 et de signalisation comme les familles de récepteurs couplés aux protéines G. Toutes ces familles de protéines participent activement à l'établissement de la plasticité synaptique, qui constitue la capacité de la synapse à être constamment remodelée afin de répondre à une demande pré-synaptique. La force synaptique constitue quant à elle la capacité à répondre de façon efficace à l'influx pré-synaptique. Cette force synaptique est directement liée à la composition de la densité post-synaptique (post-synaptic density, PSD), sous-structure de l'épine dendritique.

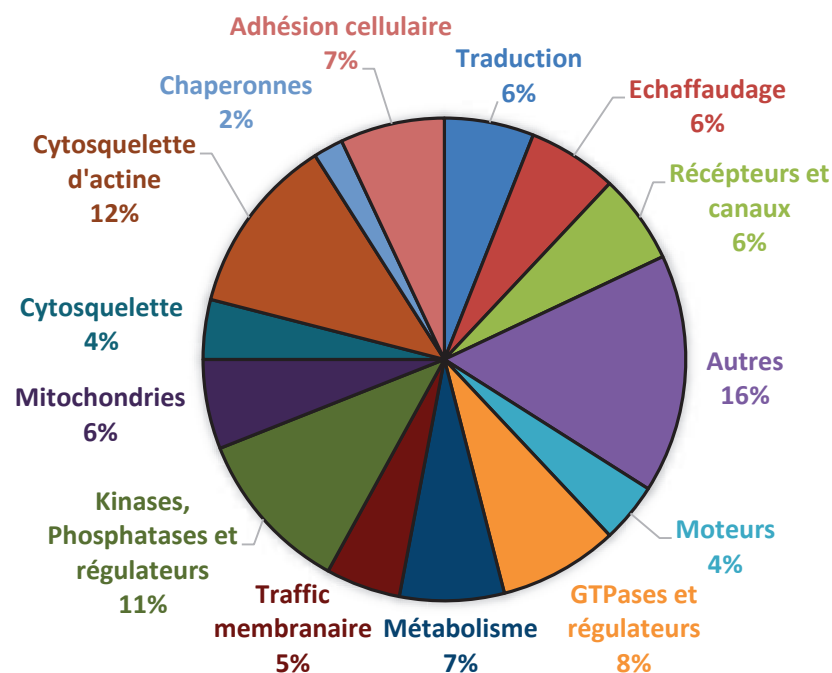
4. La densité post-synaptique

La densité post-synaptique tient son nom de sa propriété d'être une région dense aux électrons en microscopie électronique. Cette zone possède des caractéristiques biochimiques qui la rendent résistante aux détergents comme le triton, et ce, en raison de sa haute teneur en protéines et lipides (Carlin *et al.*, 1980). C'est cette particularité biochimique qui est exploitée afin de l'isoler et de l'étudier. La PSD est accolée à la membrane post-synaptique et est constituée d'un large panel de protéines de structure, de signalisation et de récepteurs. Elle est ainsi considérée comme un énorme complexe protéines-membrane spécialisé dans la signalisation post-synaptique et la plasticité.

4.1. Composition de la PSD

En plus de disposer d'une grande quantité de récepteurs ionotropiques, c'est-à-dire de récepteurs canaux, la PSD présente une grande variété de récepteurs à activité tyrosine kinase, couplé aux protéines G, de canaux ioniques et de molécules d'adhésions cellulaires, responsables du lien physique et de la communication entre la pré-synapse et la post-synapse (voir graphique 1).

Graphique 1: Diversité de fonctions des composants protéiques la densité post synaptique. (Adapté de Sheng et Hoogenraad, 2007).



Les changements dans l'activité synaptique vont induire des modifications de la composition protéique de l'épine. Les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles, être recrutées ou être transportées hors de l'épine (Ehlers, 2003). Un des acteurs majeurs de ces réorganisations est le cytosquelette d'actine.

5. L'actine synaptique

5.1. Généralités

Durant la dernière décennie, plusieurs études sur la signalisation post-synaptique ont démontré que le cytosquelette d'actine jouait un rôle central dans la formation, l'élimination, la motilité, stabilité, la taille et la morphologie des épines (Halpain, 2000 ; Schlager, 2002 ; Ethell et Pasquale, 2005 ; Schubert, 2006 ; Tada et Sheng, 2006). Des modulations de l'actine régissent les changements morphologiques des épines dendritiques, associé aux modifications de la force synaptique (Cingolani et Goda, 2008 ; Matus, 2000). Le cytosquelette d'actine contribue non seulement à la globalité de la structure de la synapse mais joue aussi un rôle dans les activités synaptiques allant de l'organisation de la densité post-synaptique (Sheng et Hoogenraad, 2007), l'ancrage des récepteurs post-synaptiques (Renner *et al.*, 2008) afin de faciliter le transport des cargos synaptiques (Schlager et Hoogenraad, 2009) ainsi qu'à la localisation de la machinerie de traduction (Bramham, 2008). Plus récemment, il a été montré par Jaworski et collaborateurs que les microtubules, autre élément du cytosquelette, étaient aussi présents de façon transitoire dans les épines dendritiques (Jaworski *et al.*, 2009) (Figure 6). Leur rôle dans ce compartiment reste encore peu connu mais ils pourraient participer à l'apport de protéines à l'épine.

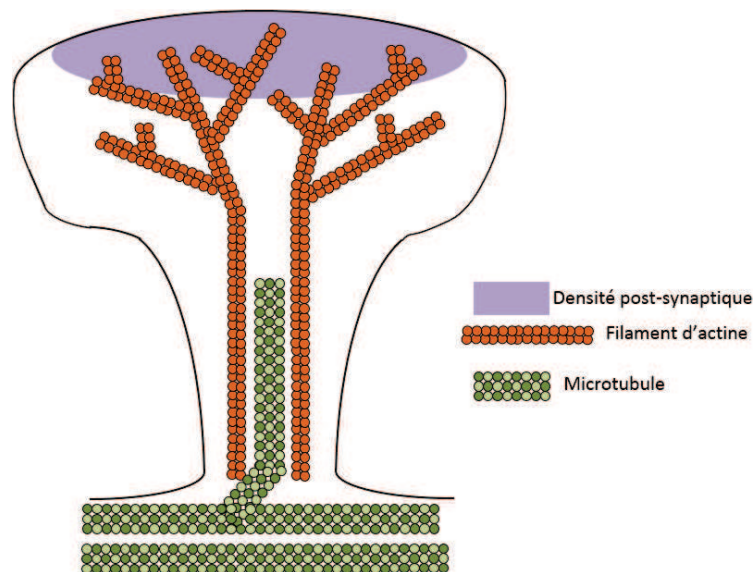


Figure 6 : Schéma de la répartition du cytosquelette d'actine et microtubule dans une épine dendritique.

Les premières études de microscopie électronique ont montré que l'actine était le composant majeur du cytosquelette des épines dendritiques (Landis *et al.*, 1983). Le rôle de l'actine dans les épines matures est de stabiliser les protéines post-synaptiques (Allison *et al.*, 1998 ; Kuriu, 2006 ; Renner *et al.*, 2009) et de moduler ainsi la structure de la tête de l'épine en réponse à la signalisation post-synaptique (Fischer *et al.*, 2000 ; Okamoto *et al.*, 2004 ; Star *et al.*, 2002). Des études en spectrométrie de masse ont révélé de nombreuses protéines de liaison avec l'actine dont notamment la CaMKII β (Calmodulin-dependent protein kinase 2 β), la cortactin, la debrin A ou encore la neurabin 1 (Cheng *et al.*, 2006). L'inhibition de ces protéines réduit la formation et la maturation des épines dendritique (Hering et Sheng, 2003 ; Ivanov *et al.*, 2009 ; Okamoto *et al.*, 2007 ; Terry-Lorenzo, 2005) illustrant ainsi leur rôle crucial pour la plasticité synaptique et la formation de la mémoire (Kojima *et al.*, 2010 ; Wu *et al.*, 2008).

5.2. Un cytosquelette dynamique

Le cytosquelette d'actine est retrouvé principalement dans les épines dendritiques. L'actine existe à l'état de monomère (actine-G) et filamenteuse (actine-F).

L'actine filamenteuse, bien que présente au niveau pré-synaptique, est principalement retrouvée au niveau post-synaptique (Landis *et al.*, 1983) où cet élément est capital pour la synapse et sa fonctionnalité. L'utilisation de la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP : fluorescence recovery after photobleaching) a pu mettre en évidence ce rapide renouvellement de l'actine (turn-over) dans les épines. L'actine-F dans les épines dendritiques est sous forme extrêmement dynamique. Parmi les filaments d'actine de l'épine dendritique, environ 85% d'entre eux sont dynamiques, tandis que 15% sont plus figés. L'actine hydrolyse un ATP en ADP, ce qui fournit l'énergie nécessaire à son incorporation dans le filament, c'est la polymérisation. Globalement, les filaments se polymérisent et dépolymérisent constamment, permettant un demi-recouvrement des filaments toutes les 44.2 secondes en moyenne (Star *et al.*, 2002). L'actine se polymérise activement au bout « + » et se dépolymérise plus lentement au bout « - » ce qui lui confère l'attribut de tapis roulant, soit « treadmilling » (Figure 7).

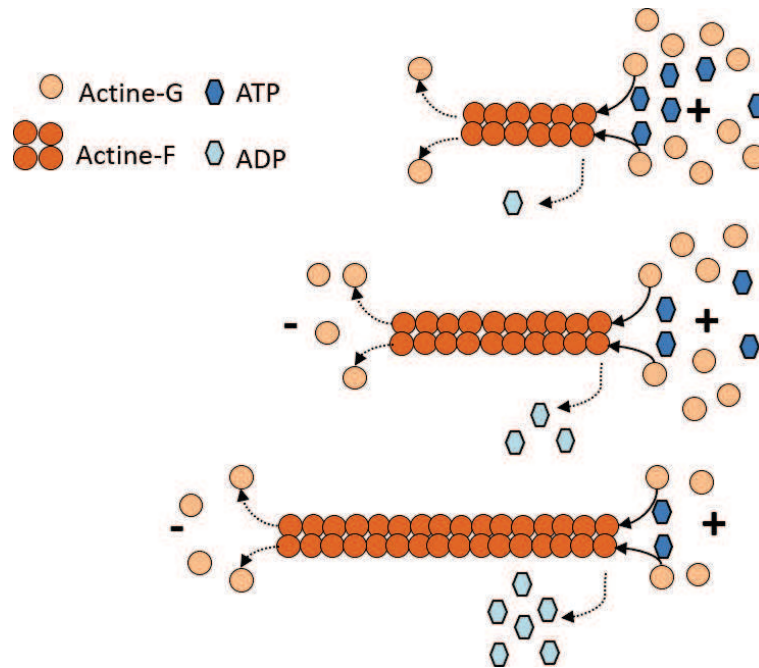


Figure 7 : Schéma du « tapis roulant » de la polymérisation de l'actine. L'actine polymérise (+) plus rapidement qu'elle ne dépolymérise (-), conduisant à l'élongation du filament.

Le réarrangement du cytosquelette d'actine régit ainsi la formation et la perte des épines dendritiques. Le degré de polymérisation affecte la morphologie des épines dendritiques (Cingolani et Goda, 2008). Ainsi lors d'un protocole de potentialisation à long terme (LTP) paradigme expérimental modélisant les aspects moléculaires de la mémoire, qui sera discuté à la fin de ce chapitre, une modification du ratio actine-G / actine-F a lieu en faveur de la formation d'actine F participant à l'augmentation du volume de l'épine. A l'inverse, la dépression à long terme, LTD (long term depression) va favoriser le ratio au profit de l'actine-G en dépolymérisant les filaments et va induire un rétrécissement de l'épine (Okamoto *et al.*, 2004). Plusieurs études ont été menées pour mieux comprendre cette dynamique et l'organisation du cytosquelette au sein de l'épine. L'équipe de Kasai et collaborateurs a montré qu'au sein de la synapse existent trois groupes d'actine-F avec différents temps de renouvellement. En utilisant la technique d'activation bi-photonique à l'aide d'une protéine fluorescente verte photo-activable (PAGFP : photo activatable green fluorescent protein) fusionnée à l'actine monomérique (actine-G), ils ont mis en évidence un pool dynamique (turn over 40 s) un pool d'élargissement (2 à 15 min), et un pool stable (17 min) Cette étude illustre l'importance de l'actine et de sa régulation au sein de l'épine. Ainsi, au sein de la structure hautement spécialisée qu'est l'épine dendritique, la dynamique du cytosquelette d'actine joue un

rôle crucial dans le maintien de la forme et de la fonction dendritique.

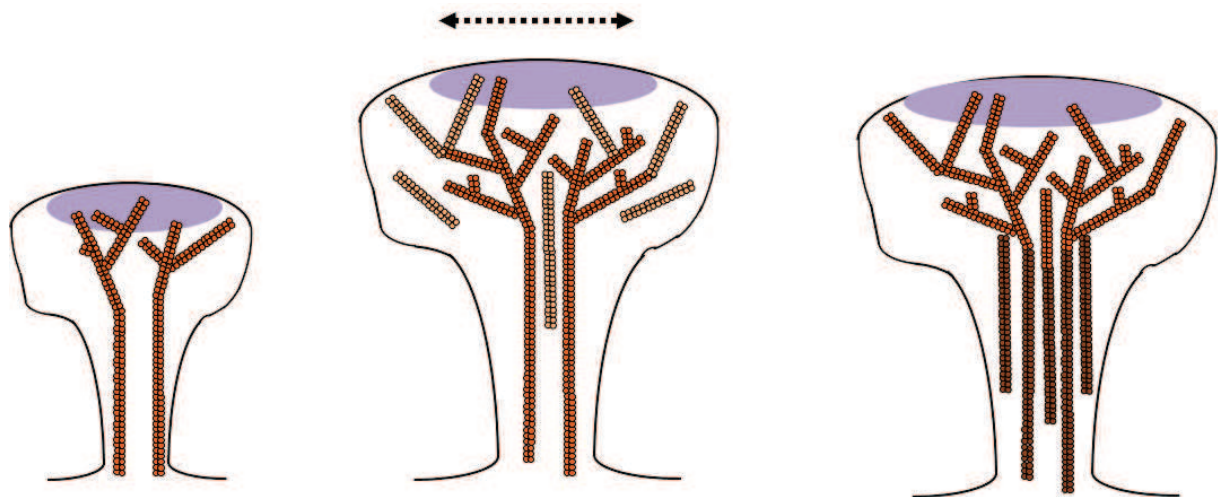


Figure 8 : Modélisation de l'organisation des groupes de cytosquelette d'actine dans l'épine dendritique : Premier pool dynamique (orange), deuxième pool: pool d'élargissement, moins dynamique (orange clair), puis troisième épine, installation d'un pool stable (en orange foncé).

5.3. Réorganisation récepteurs dépendante

La signalisation qui régule le cytosquelette d'actine est principalement dépendante des récepteurs synaptiques ionotropiques comme les récepteurs au glutamate AMPA et NMDA (Fischer *et al.*, 2000). Les récepteurs NMDA régulent le cytosquelette d'actine via deux voies : l'une en contrôlant l'influx des ions calcium dans le neurone post-synaptique, modulant ainsi l'activité de nombreuses protéines interagissant avec l'actine, comme CaMKII (Lisman *et al.*, 2002) et la gelsolin (Nag *et al.*, 2009), l'autre en interagissant directement avec ces protéines, en plus de l'actinin (Wyszynski *et al.*, 1997), de la myosine (Bajaj *et al.*, 2008). D'autres protéines, comme les récepteurs à tyrosine kinase de la famille Trk (récepteurs au BDNF, (Menna *et al.*, 2009) et de la famille des Eph/ephrine (Schubert et Dotti, 2007), ainsi que les molécules d'adhésion synaptiques comme la N-cadherin, dont la signalisation (Yoshihara *et al.*, 2009 ; Xie *et al.*, 2008) ont été décrites comme importantes dans la régulation de l'actine des épines dendritiques.

6. Les récepteurs glutamatergiques

La majorité des neurones excitateurs du système nerveux central sont glutamatergiques et le glutamate est estimé comme étant libéré par plus de la moitié des synapses cérébrales. Il existe plusieurs récepteurs au glutamate, les récepteurs ionotropiques et métabotropiques,

responsables de la majorité de la neurotransmission excitatrice. Les récepteurs métabotropiques sont classés sous le nom de mGluR, mais ils ne seront pas décrits ici. Il existe 3 types de récepteurs ionotropiques qui sont les récepteurs AMPA, NMDA et kaïnate (Dingledine et al., 1999; Hollmann et al., 1989). Leurs noms proviennent de leurs agonistes pharmacologiques : l'AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate), le NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et l'acide kaïnique. Tous les récepteurs ionotropiques laissent passer les cations Na^+ (sodium) et K^+ (potassium) de façon non sélective ainsi que dans certains cas du Ca^{2+} (calcium). Seuls les récepteurs AMPA et NMDA seront décrits dans ce chapitre.

6.1. Les récepteurs AMPA

6.1.1. Structure et composition

Les récepteurs α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate ou R-AMPA sont des récepteurs tétramériques, c'est-à-dire composés de 4 sous-unités, et ionotropiques, ils constituent un canal perméable aux ions. Ses sous-unités possèdent une forte homologie des régions extracellulaires et transmembranaires et diffèrent par leur domaine C-terminal intracellulaire. Les sous-unités GluA1 et GluA4 possèdent un domaine c-terminal long tandis que les sous-unités GluA2 et GluA3 ont un domaine C-terminal plus court. Le domaine c-terminal de ces unités est crucial dans la régulation de la fonction des R-AMPA. Cela inclut l'ouverture du canal, le déplacement et la stabilisation à la synapse (Anggono et Huganir, 2012). Les récepteurs AMPA sont assemblés en deux hétérodimères identiques. Les sous-unités GluA1 et GluA2 sont prédominantes dans les neurones hippocampiques pyramidaux suivit des hétéromères GluA2/3. La particularité de la sous-unité GluA2 est que celle-ci est seule la sous-unité des récepteurs AMPA à être perméable aux ions Ca^{2+} . La composition en sous-unité gouverne ainsi le trafic des R-AMPA à la membrane. La longue queue C-terminal (GluA1, GluA4) est importante dans l'insertion activité dépendante des récepteurs à la synapse durant le renforcement synaptique, comme la LTP par exemple. Les sous-unités ayant une queue C-terminale courte (GluA2, GluA3) sont en recyclage permanent en absence d'activité.

6.1.2. Trafic des R-AMPA

Le nombre de R-AMPA à la synapse dépend de l'endocytose et de l'exocytose à la membrane post-synaptique ainsi que de leur diffusion latérale. L'augmentation de l'exocytose (externalisation du contenu d'une vésicule par fusion avec la membrane plasmique) des récepteurs se produit durant la LTP par exemple (Kopeck, 2006) alors que l'endocytose (internalisation par invagination de la membrane dans la cellule) augmente durant la LTD

(Kessels et Malinow, 2009). L'acheminement des R-AMPA à la synapse dépend à la fois du transport dans des endosomes (vésicules intracellulaires) via le cytosquelette d'actine par les dyneines et les kinésines (voir pour revue Kneussel et Wagner, 2013) et de la fusion à la membrane de ces vésicules dépendantes des SNAREs, protéines transmembranaires catalysant les réactions de fusion membranaire (Südhof, 2004). Les R-AMPA peuvent aussi être insérés à la membrane au niveau du soma et des dendrites et être acheminés par diffusion latérale. Le lieu spécifique de l'exocytose des R-AMPA n'a pas encore été véritablement élucidé. Des études ont montré une insertion dendritique puis une incorporation à la synapse (Makino et Malinow, 2009) tandis que d'autres décrivent plutôt une incorporation directe à la PSD (Kennedy *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2008). D'autres données suggèrent qu'il existe un groupe de réserve des R-AMPA dans la zone endocytique post-synaptique qui, par sa proximité, permet le maintien de la force synaptique durant la LTP (Petrini *et al.*, 2009). Les récepteurs AMPA présentent une distribution membranaire régulée à la fois par la réorganisation actine-dépendante de la PSD et par leur stabilisation à la synapse par leurs interaction avec PSD-95 (Colledge *et al.*, 2003 ; Kerr et Blanpied, 2012 ; Yudowski *et al.*, 2013) (Figure 9).

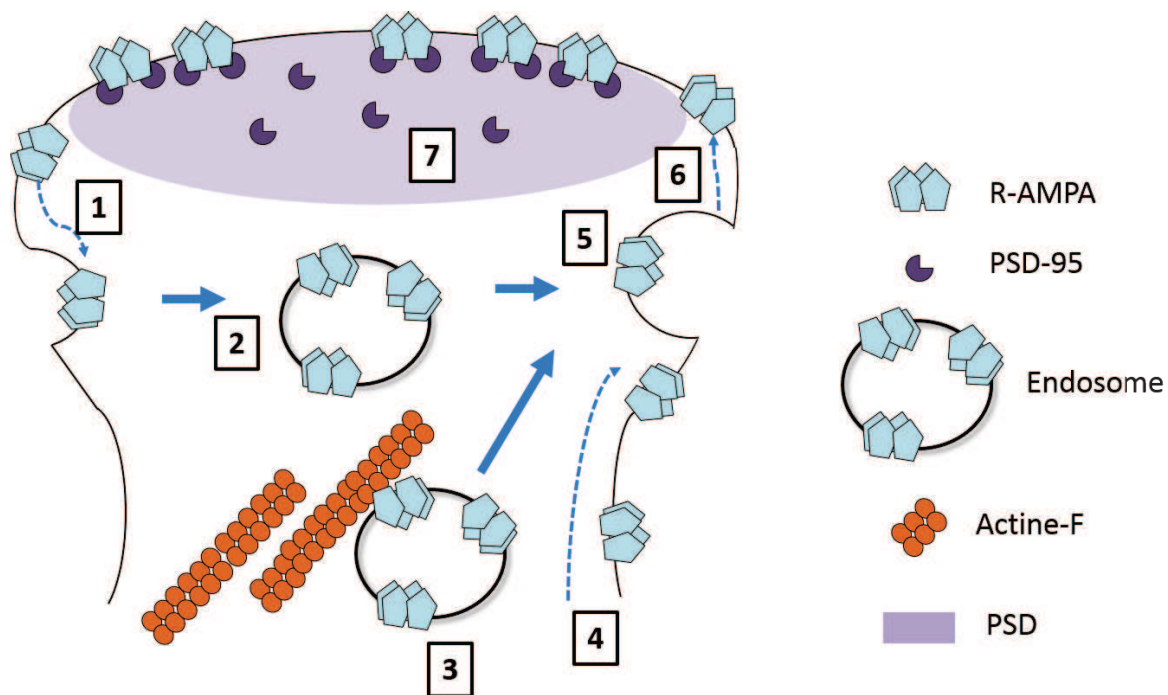


Figure 9 : Schéma simplifié de la dynamique de recyclage et d'insertion des récepteurs AMPA à la synapse. Les récepteurs sont recyclés à la membrane par endocytose (1). Ils sont inclus dans des endosomes stockés à la synapse (2), ou évacués en dehors de l'épine. Lors d'une forte activité synaptique, les récepteurs sont recrutés et sont acheminés soit via le cytosquelette d'actine vers la membrane ou directement à la synapse (3) soit par diffusion latérale le long des dendrites pour être acheminés à la synapse (4 et 6). Les vésicules contenant les AMPA

recyclés peuvent aussi être réexocytées à la membrane synaptique (5). Les récepteurs sont alors stabilisés à la PSD grâce à la PSD-95 et au cytosquelette d'actine – qui n'apparaît pas ici pour plus de clarté (Inspiré de Anggono and Haganir, 2012 ; Kerr and Blanpied, 2012 ; Makino et Malinow, 2009).

Les R-AMPA sont donc primordiaux dans la neurotransmission excitatrice. Ils constituent un élément clef dans les phénomènes de renforcement ou affaiblissement synaptique comme la LTP et la LTD. Un autre type de récepteur au glutamate est lié à ces phénomènes, ce sont les récepteurs NMDA (R-NMDA).

6.2. Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropiques et possède une cinétique d'activation particulière car leur ouverture dépendant à la fois d'un relargage de glutamate pré-synaptique et d'une forte dépolarisation de la membrane post-synaptique. Cette dépolarisation de la membrane induit la libération d'ion magnésium qui obstrue le pore du canal à l'état de repos (Nowak *et al.*, 1984). Ce canal est perméable aux ions sodium (Na^+), potassium (K^+) et calcium (Ca^{2+}), ce dernier agissant comme un messenger secondaire fondamental pour la modification de la synapse.

6.2.1. Structure et composition

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs tétramériques constitués obligatoirement de deux sous-unités GluN1 et de deux sous-unités régulatrices pouvant être GluN2A, B, C et D ou GluN3A, B. La combinaison en sous-unités des R-NMDA détermine les propriétés fonctionnelles des canaux des récepteurs (Cull-Candy et Leszkiewicz, 2004). Ces sous-unités se présentent dans des combinaisons di-hétéromères (GluN1/GluN2A/GluN2B) ou tri-hétéromères (GluN1/GluN2A ou GluN1/GluN2B). Il y a donc une grande hétérogénéité dans la composition des R-NMDA dans les épines dendritiques. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des sous-unités comme l'ifenprodil, spécifique des sous-unités GluN2B induit un taux de blocage des courants NMDA variable (Sobczyk, 2005) illustrant la diversité de la composition des récepteurs. Les sous-unités GluN2A et GluN2B sont les sous-unités prédominantes dans le cortex. Elles diffèrent par leur cinétique d'ouverture du canal, leur localisation synaptique et leurs partenaires protéiques, influençant ainsi la plasticité synaptique (Paoletti et Neyton, 2007; Yashiro et Philpot, 2008). Outre la disparité d'expression des différentes sous-unités des R-NMDA dans différentes structures cérébrales, il existe également une disparité dans la localisation cellulaire des récepteurs.

6.2.2. Localisation synaptique et extra-synaptique

Des études ont permis de distinguer des R-NMDA strictement localisés à la synapse, qualifiés de synaptiques, et d'autres situés à l'extérieur de la synapse appelés extra-synaptiques. Les récepteurs synaptiques et extra-synaptiques sont différenciés non seulement par leur localisation mais aussi par l'induction préférentielle de voies de transduction différentes. De façon générale, une fonction neuroprotectrice est attribuée aux récepteurs synaptiques tandis qu'une fonction plutôt délétère est attribuée aux récepteurs extra-synaptiques (Hardingham *et al.*, 2002). Ainsi, les R-NMDA synaptiques promeuvent l'induction de gènes de survie, l'activation de CREB (cAMP response element binding, impliqué dans la plasticité synaptique, la neurogenèse, l'apprentissage et la mémoire) en supprimant l'expression des gènes pro-apoptotiques (*Puma*), de FOXO (Forkhead box protein O) impliquée dans l'induction de la mort neuronale ou encore en activant les défenses contre le stress oxydatif (Papadia *et al.*, 2008). A l'inverse, les récepteurs extra-synaptiques vont promouvoir les voies de mort neuronale, par exemple en inhibant CREB, ERK1/2, par activation de la calpain, ou encore de FOXO. Ainsi, la signalisation calcique, initiée par les R-NMDA synaptiques, permet la communication entre les synapses et le noyau afin de promouvoir la survie neuronale (Hardingham et Bading, 2010). Les récepteurs extra-synaptiques agissent comme des antagonistes à cet effet protecteur en perturbant la communication synapse-noyau à plusieurs niveaux. Un déséquilibre des R-NMDA synaptiques/extra-synaptiques pourraient donc participer à la perte synaptique rencontrée dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la chorée de Huntington. L'utilisation de la mémantine, un bloqueur de canaux ouverts spécifique des récepteurs NMDA, permet de réprimer la mort neuronale dépendante des récepteurs extra-synaptiques et constitue actuellement le seul antagoniste NMDA utilisé pour traiter les cas les plus avancés de la maladie d'Alzheimer (Atri *et al.*, 2013).

6.3. Les partenaires des récepteurs NMDA et AMPA

6.3.1. PSD-95

La protéine de la densité post-synaptique 95 ou PSD-95, aussi nommée SAP-90 est membre de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK), est très abondante dans la PSD et régule de nombreux aspects de la transmission synaptique. PSD-95 interagit avec de nombreuses protéines à la synapse dont les récepteurs ionotropiques au glutamate (R-AMPA, R-NMDA) les canaux ioniques, et les molécules d'adhésions cellulaire. Elle interagit aussi avec des protéines d'échafaudage, le cytosquelette d'actine et des protéines de signalisation (Xu,

2011). Elle est impliquée dans la localisation synaptique des récepteurs NMDA (Kim and Sheng, 2004) par son interaction avec la queue C-terminale des sous-unités GluN2 (Kornau *et al.*, 1995 ; Niethammer *et al.*, 1996). PSD-95 interagit aussi avec les récepteurs AMPA et permet leur stabilisation à la synapse (Colledge *et al.*, 2003 ; Schnell et Sizemore, 2002 ; Yudowski *et al.*, 2013). La stabilisation de PSD-95 à la synapse est dépendante de modifications post-traductionnelles telle que la palmitoylation, qui consiste en l'ajout d'une chaîne lipidique sur la protéine lui permettant de s'associer à la membrane cellulaire (El-Husseini et Brecht, 2002) ou telle que la phosphorylation. Ainsi, la serine 295 lorsqu'elle est phosphorylée favorise le recrutement et la stabilisation des R-AMPA à la synapse et participe à l'accumulation de PSD-95 à la synapse (Kim *et al.*, 2007) tandis que la phosphorylation de la sérine 73 a l'effet inverse (Steiner *et al.*, 2008). La PSD-95 a donc une place importante dans le fonctionnement et dans la morphologie de l'épine (Ehrlich *et al.*, 2007).

6.3.2. Fyn

Fyn est une protéine de la famille des Src tyrosine kinase et s'exprime dans différents types cellulaires. Dans les neurones, elle est retrouvée au niveau synaptique où elle est associée à la membrane et participe à la signalisation et au processus de LTP (Grant *et al.*, 1992 ; Kojima *et al.*, 1997). Elle interagit avec PSD-95 et les R-NMDA, plus spécifiquement la sous-unité GluN2B et influence sur les courants de ces derniers.

Toutes ces protéines participent à la plasticité synaptique. L'une des formes de plasticité synaptique peut être induite de façon électrique par stimulation haute fréquence du neurone pré-synaptique : la potentialisation à long terme (ou LTP Long Term Potentiation) qui est un paradigme expérimental reproduisant une des formes de plasticité synaptique associée aux phénomènes moléculaires à la base des processus de consolidation de la mémoire.

7. La potentialisation à long terme (LTP)

7.1. Découverte de la LTP

La potentialisation à long terme fut découverte la première fois en Norvège dans le laboratoire de Per Andersen par Terje Lomo en 1966, mais c'est avec Tim Bliss qu'il publiera les premiers résultats sur la LTP en 1973 (Bliss et Lomo, 1973). C'est par une stimulation à haute fréquence de la voie perforante dans l'hippocampe entraînant une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le gyrus denté qu'il fit cette découverte. L'organisation des neurones de l'hippocampe permet de faire des coupes épaisses laissant ainsi intacts la plupart

des circuits impliqués. Cette augmentation persistante de l'efficacité a également été mise en évidence au niveau des connexions entre la collatérale de Schaffer (cellules pyramidales de la Corne d'Ammon « *cornu ammonis* » CA3) et les épines dendritiques de la région CA1 de l'hippocampe (Andersen *et al.*, 1977).

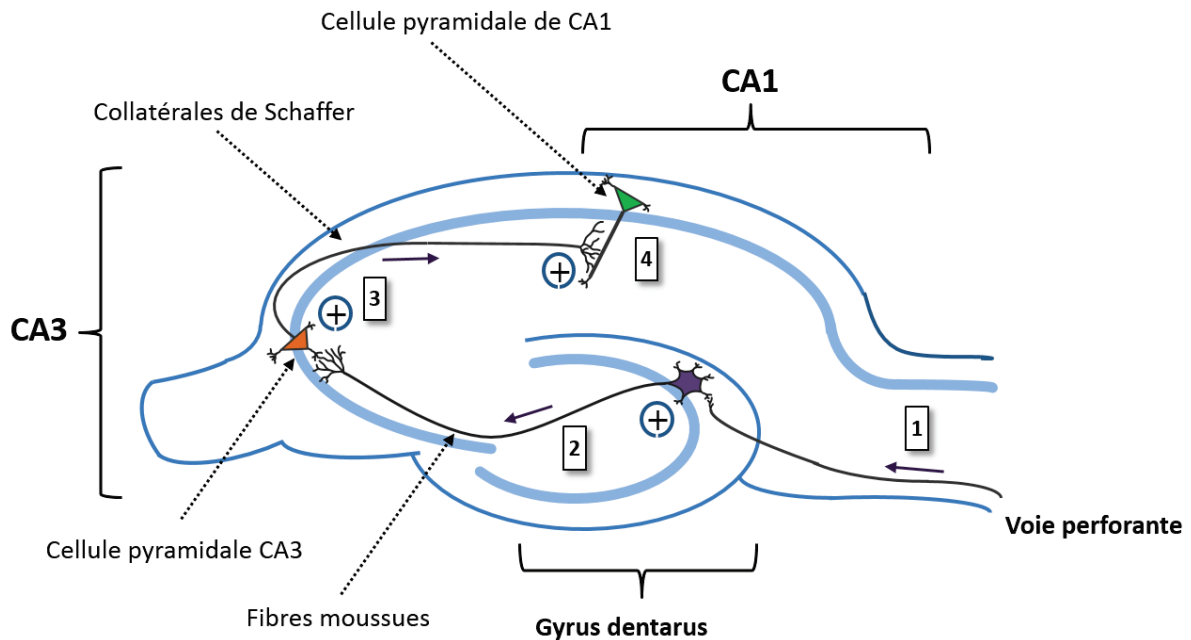


Figure 10 : Schéma d'une coupe d'hippocampe de rongeur illustrant les principales régions. Les voies excitatrices sont illustrées par des flèches et le signe +. Dans l'ordre, l'influx venant du cortex entorhinal suit la voie perforante (1) puis la voie des fibres moussues du Gyrus dentatus (2) qui connecte la collatérale de Schaffer dans la Corne d'Ammon (CA3) (3) qui rejoint les cellules de la CA1(4). Cette voie a permis de mettre en évidence la LTP.

La LTP peut perdurer plusieurs jours lorsqu'elle est induite in vivo (Douglas et Goddard 1975). La modulation des acteurs de la LTP provoque des modifications des capacités d'apprentissage chez l'animal. Ainsi, l'utilisation d'antagonistes affectant les protéines synaptiques induit des altérations dans les tâches de mémorisation (Morris *et al.*, 1986 ; Staubli *et al.*, 1989) tandis que l'augmentation ou la diminution de l'expression de ces protéines affecte les performances dans des tâches d'apprentissage (Madani *et al.*, 1999 ; Migaud *et al.*, 1998 ; Yang *et al.*, 1999). La LTP n'est pas propre aux synapses excitatrices de l'hippocampe, on l'observe dans beaucoup d'autres synapses de diverses régions du cerveau tel que l'amygdale, le cortex ou encore le cervelet.

7.2. Cascades d'événements moléculaires lors de la LTP

Au cours d'une transmission synaptique brève à basse fréquence, le glutamate libéré par la pré-synapse des collatérales de Schaffer se lie à la fois aux récepteurs AMPA et NMDA mais le potentiel de membrane du neurone post-synaptique est à son niveau normal de repos. Les R-NMDA seront donc bloqués par l'ion magnésium et ne laisseront passer aucun courant. Une stimulation haute fréquence comme celle appliquée lors d'un protocole de LTP entraîne une dépolarisation prolongée de la membrane ayant pour conséquence l'expulsion du bouchon magnésium hors du canal du R-NMDA. La suppression du Mg^{2+} permet le passage des ions Ca^{2+} . Il s'ensuit une augmentation du calcium au niveau post-synaptique (Lynch *et al.*, 1983). Les récepteurs NMDA sont donc les principaux responsables de l'entrée de Ca^{2+} impliquée dans la LTP (Collingridge et Kehl, 1983). L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} est centrale dans la phase de consolidation de la LTP. Elle induit l'activation des voies de transduction impliquant des protéines kinases comme les protéines kinase A et C (PKA, PKC, Ling *et al.*, 2002 ; Roberson et Sweatt, 1996), les extracellular signal-regulated kinases (ERKs, Bading et Greenberg, 1991), les phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K, Man *et al.*, 2003) et les calcium calmoduline dépendante protéines kinases (CaMKs, Lisman *et al.*, 2012; Malenka *et al.*, 1989) qui participent à la consolidation et à l'amélioration de l'efficacité synaptique. Par exemple, l'activation de CaMKII induit la phosphorylation des récepteurs AMPA non synaptiques et augmente leur intégration à la PSD grâce à la phosphorylation de GluA1 en sérine 831 (voir pour revue Lisman *et al.*, 2012).

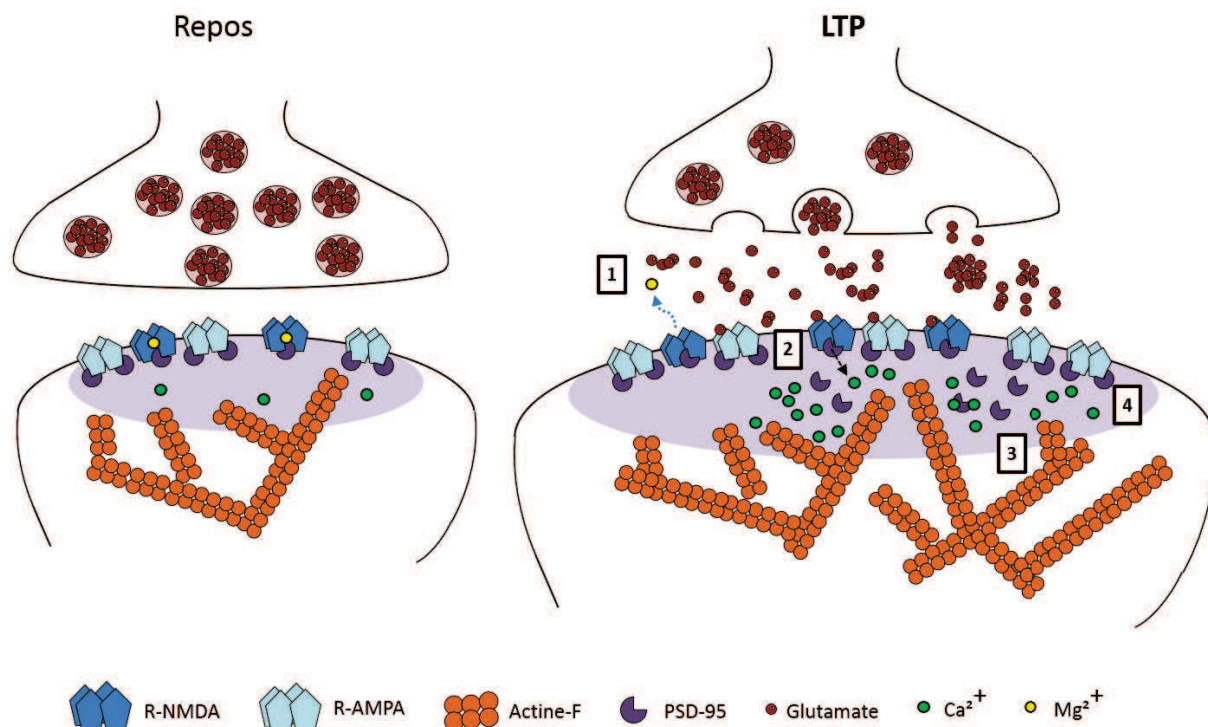


Figure 11 : Schéma simplifié des mécanismes synaptiques de la LTP. A l'état de « repos », les R-NMDA sont bloqués par un ion Mg^{2+} , la synapse est dans un état de base (gauche). Lors d'une stimulation synaptique haute fréquence (droite), le compartiment pré-synaptique largue des vésicules de neurotransmetteurs (glutamate) qui va aller interagir avec ses récepteurs, ici R-AMPA et R-NMDA (1). Cette stimulation va créer une dépolarisation membranaire et éjecter l'ion magnésium des R-NMDA et ainsi ces récepteurs vont laisser entrer des ions donc du Ca^{2+} (2), élément majeur qui va activer plusieurs voies de signalisation qui vont conduire à une réorganisation de l'actine en faveur de l'élargissement de la synapse (3), un recrutement des R-AMPA, de PSD-95 et R-NMDA (Delint-Ramírez et al., 2008 ; Harney et al., 2008) (4). L'action et l'interaction de ces éléments participent ainsi à la potentialisation de la force synaptique et à la stabilité de la synapse dans le temps. Ne sont représentés ici que quelques acteurs de ce phénomène, beaucoup d'autres y participent. C'est le modèle moléculaire de la mémoire.

Ainsi, la LTP repose sur l'activation des R-NMDA (Liu, 2004) et sur l'activation subséquente des voies de transduction qui provoquent une augmentation de la synthèse protéique et une réorganisation de la synapse nécessaire au maintien de la LTP. Ces phénomènes se traduisent par une trace physique participant à l'élaboration des souvenirs (Kandel, 2001; Nguyen et Woo, 2003 ; Lynch, 2004) .

Il existe une autre forme de plasticité, souvent mise en opposition avec la LTP, il s'agit de la LTD, la dépression à long terme, qui va affaiblir les synapses. Au même titre que la LTP, ce phénomène est important dans les processus de mémorisation. Une stimulation basse fréquence prolongée induit une activation des R-AMPA et NMDA, mais l'entrée de Ca^{2+} est moins

importante que lors de l'induction d'une LTP (Yang *et al.*, 1999). La faible entrée de Ca^{2+} va activer cette fois-ci des phosphatases calcium dépendantes et conduire *in fine* à la diminution du volume et de l'efficacité synaptique (Kourrich *et al.*, 2008; Mauna *et al.*, 2011).

Ces phénomènes de plasticité synaptique sont altérés dans la maladie d'Alzheimer. Il est admis aujourd'hui que cet altération résulte de l'effet du peptide β -amyloïde mais son action est aussi dépendante de la protéine tau (Shipton *et al.*, 2011).

Chapitre 3 : La protéine tau

La protéine tau a été découverte en 1975 (Weingarten et Lockwood, 1975) et identifiée comme facteur protéique essentiel dans la formation des microtubules. Depuis, cette protéine a fait l'objet de nombreuses études, d'autant plus depuis son identification dans les DNF chez les patients atteints de MA (Brion *et al.*, 1985 ; Delacourte et Défossez 1986, Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Longtemps considérée comme une protéine exclusivement axonale, il est maintenant admis que la répartition de la protéine tau est plus étendue (Tashiro *et al.*, 1997 ; Sultan *et al.*, 2011) et que cette protéine possède diverses fonctions dont les mécanismes sous-jacents font actuellement l'objet d'intensives investigations.

1. Isoformes et épissage

La protéine tau (tubulin associated unit) est une protéine codée par un gène unique, MAPT (microtubule associated protein tau), qui est situé sur le chromosome 17. La protéine tau est exprimée principalement dans les neurones, mais aussi dans les astrocytes, les oligodendrocytes (LoPresti *et al.*, 1995 ; Müller *et al.*, 1997) où elle participe au processus de myélinisation (Klein *et al.*, 2002), et dans les muscles (Gu *et al.*, 1996).

Tau peut être subdivisé en 4 régions : une région de projection N-terminale, un domaine riche en proline (prolin-rich domain PRD), un domaine d'interaction avec les microtubules (microtubule binding domain MBD) et une région C-terminale (Sergeant *et al.*, 2005 ; Figure 12). L'épissage alternatif du transcrit primaire de tau génère 6 isoformes dans le cerveau humain adulte (Figure 12). Ces 6 isoformes possèdent alternativement les séquences codées par les cassettes exoniques 2, 3 et 10 parmi 13 exons. (Andreadis, 2005). Une isoforme plus longue, appelée « Big tau » existe au niveau du système nerveux périphérique et comprend un exon supplémentaire (Goedert 1992 ; Couchie 1992).

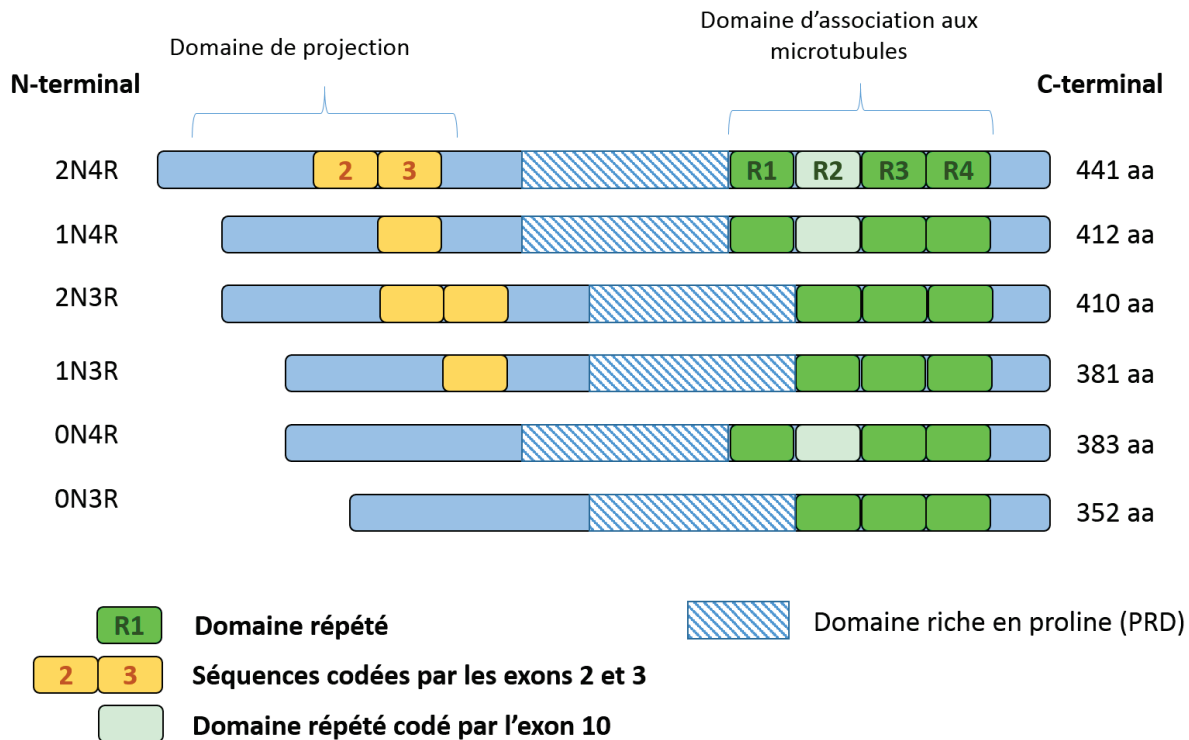


Figure 12 : Les isoformes de tau et leurs structures présentes dans le cerveau humain adulte. Les domaines répétés correspondent aux sites de liaison aux microtubules.

Les produits protéiques issus de cet épissage portent le nom de xNyR, x pour le nombre d'insert(s) inclus en N-terminal dans le domaine dit « de projection » et y pour le nombre de domaine(s) répété(s) de liaison aux microtubules (repeat domain, RD) dans le domaine d'association aux microtubules en C-terminal. Les 6 isoformes générées sont 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R, 2N4R dont la taille est comprise entre 352 et 441 acides aminés (Goedert *et al.*, 1989 ; Goedert et Jakes, 1990). Les isoformes les plus abondantes dans le cerveau humain sont les formes 1N3R et 1N4R avec une représentation égale des forme 3R et 4R tandis la 4R est prédominante chez le rongeur (Lee et Leugers, 2012). Les rôles de chacune des isoformes ne sont pas encore bien identifiés, cependant il existe des différences d'affinités des isoformes selon le nombre de R qu'elles possèdent pour certains partenaires comme les microtubules ou fyn. Le rôle des domaines alternatifs codés par les exons 2 et 3 sont moins connus. Il ont cependant été décrits comme importants dans le maintien du diamètre axonal mais aussi dans l'interaction de tau avec la membrane plasmique (Hirokawa 1988 ; Brion *et al.*, 1995). La séquence codée par l'exon 3 n'apparaît jamais indépendamment de celle de l'exon 2, seul ce dernier peut apparaître seul dans le domaine N-ter.

2. Modifications post-traductionnelles de tau

A l'état physiologique, tau est une protéine hautement soluble et est soumise à un ensemble complexe de modifications post-traductionnelles. Il existe une dizaine de types de modifications parmi lesquelles on trouve l'acétylation (Min *et al.*, 2010), la transglutamination (Wilhelmus *et al.*, 2009), la glycation (Ledesma *et al.*, 1994), la nitration (Reyes *et al.*, 2008), la sumoylation (Dorval, 2006), l'O-GlcNAcylation (Arnold *et al.*, 1996) et l'ubiquitination (Cripps, 2006). La diversité de ces types de modifications suggère que tau est soumise à de nombreuses régulations. La protéine tau peut aussi subir des clivages par des enzymes. Ainsi, la calpaïne génère un fragment de 17 kDa qui possède une activité biologique (Park et Ferreira, 2005). L'une des modifications post-traductionnelles de tau la plus importante en termes de résidus touchés et la plus importante quant à la physiopathologie de cette protéine est la phosphorylation.

2.1. La phosphorylation

Il existe environ 85 sites potentiels de phosphorylation sur la protéine tau. Ils sont situés sur des résidus serine, thréonine et tyrosine (Noble *et al.*, 2013). Ces phosphorylations influent sur la capacité de tau à interagir avec ses différents partenaires, comme les microtubules par exemple. Il existe de nombreuses kinases pouvant phosphoryler tau dont une vingtaine a été identifiée et composent 4 groupes distincts. Le premier groupe est composé des kinases dirigées sur des résidus sérine ou thréonine suivi d'une proline (PDPK) comme la kinase dépendante des cyclines 5 (cdk5, Hernandez *et al.*, 2009) et la 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK, Mairet-Coello *et al.*, 2013 ; Thornton *et al.*, 2011). Le deuxième groupe est composé des kinases non-prolines dirigées (Non-PDPK) comme la casein kinase 1 (Hanger *et al.*, 2007), la microtubule affinity-regulating kinase A (MARKs), l'AMP-cyclique-dépendent protein kinase A (PKA), la calcium/calmoduline dépendante kinase 2 (Litersky *et al.*, 1996) et la dual specific tyrosine regulated kinase 1A (DYRK-1A) (Noble *et al.*, 2013). La glycogène synthase kinase-3 (GSK-3) se trouve à l'interface entre ces deux groupes, phosphorylant les résidus suivi ou non d'une proline (Hanger *et al.*, 1992). Le dernier groupe est composé des tyrosines kinases incluant fyn (Lee, 2004), Abl et Syk. (Lebouvier *et al.*, 2009).

L'état phosphorylé de tau est donc dépendant des kinases et son état déphosphorylé est dépendant de phosphatases comme PP1, PP2A, PP2B, PP5 (Liu *et al.*, 2005), PP2A étant la phosphatase majeure de tau.

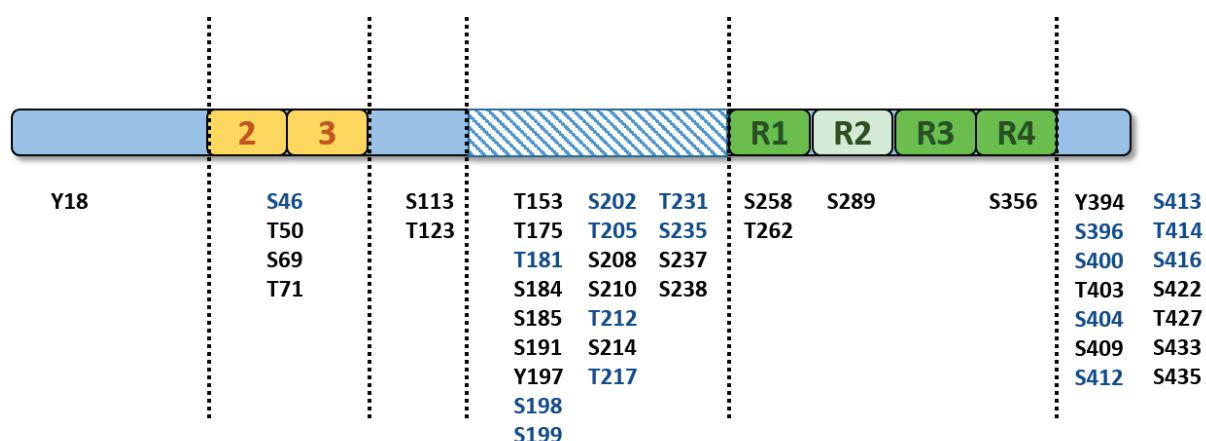


Figure 13 : Diagramme des 45 phosphorylations de tau retrouvées dans les cerveaux de patients atteints de MA. Les sites indiqués en bleu sont ceux retrouvés phosphorylés chez des cerveaux sains (non MA). (D'après Noble et al., 2013, <http://cnr.iop.kcl.ac.uk/hangerlab/tautable>).

3. Les partenaires de tau

La protéine tau interagit avec de nombreux partenaires, incluant la membrane plasmique (Brandt et al., 1995 ; Pooler et al., 2012) des molécules de signalisation, des éléments du cytosquelette et des lipides suggérant la multifonctionnalité de la protéine.

Tableau 4 : Les partenaires de tau identifiés

Partenaires de tau	Fonction du partenaire	Références
ApoE3	Transporteur lipidique	Fleming et al., 1996; Strittmatter et al., 1994
β -tubuline	Cytosquelette	Kar et al., 2003
cSrc	Kinase de la famille des Src	Lee et al., 1998; Reynolds et al., 2008
F-actin	Cytosquelette	He et al., 2006; Fulga et al., 2007
F-gr	Kinase de la famille des Src	Reynolds et al., 2008
Fyn	Kinase de la famille des Src	Lee et al., 1998; Bhaskar et al., 2005; Ittner et al., 2010
Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)	Protéine adaptatrice de la signalisation de facteur de croissance	Reynolds et al., 2008
Lck	Kinase de la famille des Src	Lee et al., 1998
p85 α	Sous-unité régulatrice de PI3K	Reynolds et al., 2008
Phosphatidylinositol	Signalisation des lipides	Surridge et Burns., 1994
Phosphatidylinositol biphosphate	Signalisation des lipides	Flanagan et al., 1997
PLCy	Clivage des lipides en molécules de signalisation	Hwang et al., 1996; Jenkins and Johnson 1998; Reynolds et al., 2008
PSD-95	Signalisation des NMDAr	Ittner et al., 2010; Mondragon-Rodriguez et al., 2012
PP2A B α	Phosphatase	Sontag et al., 2012

3.1. Les microtubules

La protéine tau fut d'abord identifiée comme une protéine promouvant l'assemblage des microtubules et modulant leur dynamique (Trinczek *et al.*, 1995). L'affinité de tau pour les microtubules diffère selon le nombre de domaine de liaison présent sur la protéine. La présence ou l'absence de l'exon 10 ajoute ou enlève une séquence codant un domaine de liaison aux microtubules, ainsi la forme 4R est plus affine pour les microtubules que la forme 3R. En plus de ces domaines, il a été montré que les régions adjacentes à ces domaines étaient aussi impliquées dans l'interaction avec les microtubules (voir pour revue Lee et Leugers, 2012). Des modifications post-traductionnelles de tau comme la phosphorylation peuvent influencer cette interaction. Par exemple la phosphorylation des résidus Serine 262 et Serine 356 induit une réduction de l'interaction de tau avec les microtubules. (Biernat *et al.*, 1993 ; Lee et Leugers, 2012 ; Litersky *et al.*, 1996). En résumé, tau déphosphorylée va se lier au microtubule et favoriser leur polymérisation et stabilisation, tandis que lorsqu'elle est phosphorylée, celle-ci s'en détache.

3.2. L'actine

Peu après la découverte de son interaction avec les microtubules, tau fut identifiée comme une protéine d'interaction avec l'actine (Griffith et Pollard, 1982). Bien que moins étudiée, cette interaction a été montrée comme dépendante des domaines de liaison aux microtubules et du domaine riche en proline dans un système purifié (He *et al.*, 2009). Cette interaction entre l'actine-F et tau a été mise en évidence dans le modèle cellulaire PC12 (Yu, 2006) et chez la drosophile exprimant une forme humaine mutante de tau (Fulga *et al.*, 2006).

3.3.Fyn

Fyn a été identifiée à la fois comme kinase de tau sur la tyr18 et comme partenaire. Fyn interagit avec le domaine riche en proline de tau via ses domaines SH2 et SH3 (Lee, 2004 ; Lee *et al.*, 1998). Une étude en système purifié a montré que les formes 3R de tau sont plus affines pour Fyn que les formes 4R, sauf si certains épitopes sont phosphorylés, alors la forme 4R peut devenir plus affine que la 3R. Ainsi, l'interaction de tau et de Fyn est à la fois dépendante de l'isoforme et des phosphorylations (Bhaskar, 2005).

4. Fonction synaptique de tau

Des travaux récents sur des synaptosomes de souris sauvages ont mis en évidence la présence de tau dans le compartiment synaptique (Ittner *et al.*, 2010 ; Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). Ittner et collaborateurs ont généré un modèle de souris exprimant une forme tronquée de tau dépourvue de son domaine d'association aux microtubules (MBD) et ont montré que cette forme de tau était exclue des dendrites et des synapses. Chez ces souris, la protéine fyn est quasiment absente du compartiment synaptique, illustrant une dépendance de fyn pour tau dans son adressage synaptique. Pour renforcer ces résultats, l'étude d'un modèle de souris n'exprimant pas tau (KO-tau) a montré une forte réduction de fyn à la PSD (Ittner *et al.*, 2010) consolidant le rôle de tau dans l'adressage de fyn à la synapse. Cette étude a donc mis en évidence un rôle synaptique de tau en tant que transporteur de fyn à la synapse (Ittner *et al.*, 2010 ; Figure 14) .

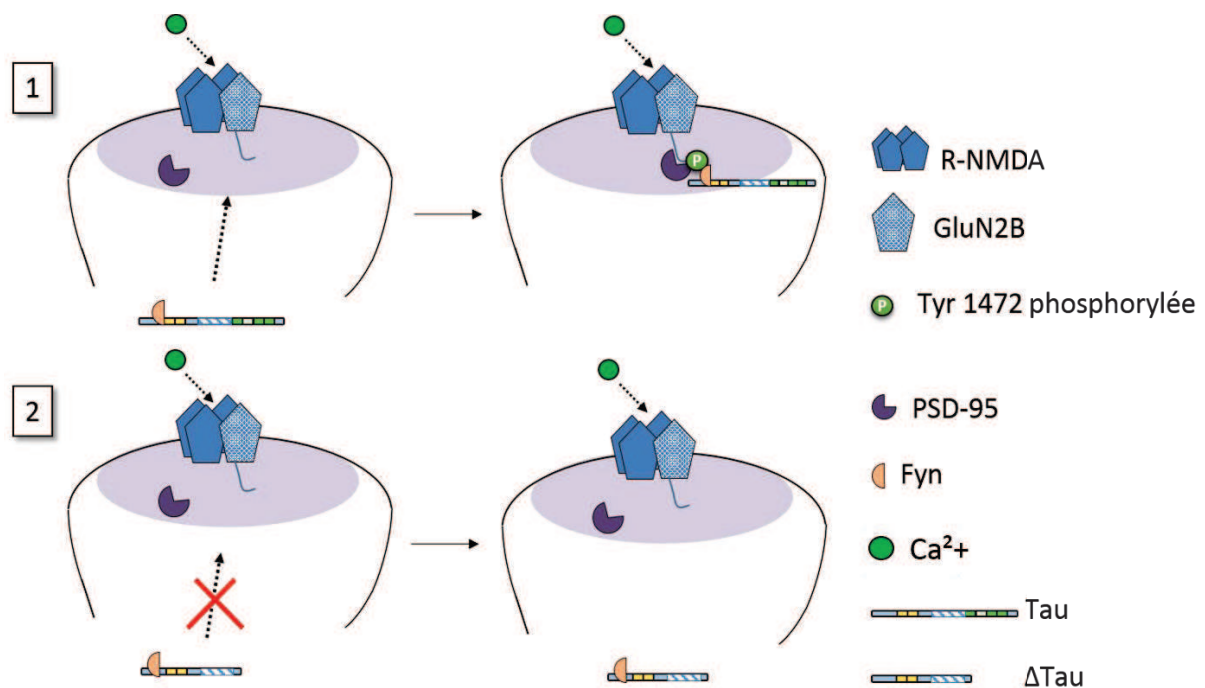


Figure 14 : Schéma simplifié du rôle de tau à la synapse. La localisation de fyn à la synapse est dépendante de tau. Tau apporte fyn à la PSD où fyn phosphoryle la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA sur son extrémité C-ter intracellulaire. Cette phosphorylation facilite l'interaction des R-NMDA avec PSD-95 qui les stabilise (1). Cette fonction de tau est dépendante du domaine d'interaction avec les microtubules, car la forme Δ tau dépourvue de ce domaine ne peut plus exercer sa fonction d'adressage de fyn (2). Modèle proposé par Ittner *et al.*, 2010.

Par la suite, Mondragon-Rodriguez et collaborateurs ont montré non seulement que la protéine tau est retrouvée à la synapse mais que son état de phosphorylation dans ce compartiment détermine ses partenaires et sa présence. L'état de phosphorylation de tau serait dépendant de l'activation des récepteurs NMDA. L'induction d'une LTD chimique par activation des récepteurs NMDA induit une augmentation de la phosphorylation de tau diminuant son interaction avec PSD-95 et favorise son départ du compartiment post-synaptique. Parallèlement, l'étude de mutants de tau phosphorylés sur les résidus Thr 111, 153, 175, 181, 205, 212, 217, 231 et Ser 199, 202, 235, 396, 404, 422 montre que la phosphorylation de ces sites favorise la LTD, et augmente les courants NMDA tandis que l'expression de mutants de tau non phosphorylables les réduisent (Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). Ces dernières découvertes mettent en avant une nouvelle fonction synaptique de tau, et mettent en évidence plusieurs partenaires synaptiques. La phosphorylation apparait comme un facteur régulant cette fonction synaptique. Tous ces éléments amènent des preuves que la protéine tau est non seulement axonale, nucléaire et dendritique, mais est aussi synaptique. En outre, son rôle dans ce compartiment reste à définir. L'étude des modèles KO-tau apporte quelques éléments de réponse.

5. Les KO-tau

Les modèles expérimentaux de réduction ou d'annulation d'expression de tau sont des moyens utiles à l'identification des rôles de tau. A l'échelle de l'organisme, les premières études sur les souris KO-Tau, générées par Harada et collaborateurs (Harada *et al.*, 1994), ont montré que ces souris ne présentaient pas de déficit cognitif spécifique. Depuis, plusieurs lignées de souris KO-tau ont été générées. Certaines lignées présentent des altérations motrices analogues à un phénotype parkinsonien. Les fonctions motrices chez les souris âgées de 12 mois sont altérées et celles-ci présentent une réduction 40% de neurones positifs à la tyrosine hydroxylase, enzyme spécifique des neurones dopaminergique dans la substance noire *pars compacta*. De plus, ces souris présentent une atrophie cérébrale avec réduction de 8% de leur poids cérébral comparé à ceux des souris contrôles. Ces souris présentent un score bas dans la réussite de test de mémoire spatiale et présentent une diminution de l'expression de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), proBDNF (précurseur du BDNF) et son récepteur TRkB (Lei *et al.*, 2012), ces molécules étant des facteurs de croissance fondamentaux pour les neurones et le développement des synapses ainsi que dans la mémoire à long terme. L'étude dans des cultures de neurones par Chen et collaborateurs (Chen *et al.*, 2012) a montré que les phénomènes de plasticités

induits par le BDNF était tau-dépendant corroborant ainsi avec l'étude de Lei et collaborateurs. Cependant, les données obtenus sur les diverses souches de souris KO-Tau ont montré que la plupart des souris ne présentent pas de déficits marqués de mémoire. Cette absence d'effet peut être expliquée par un phénomène compensatoire. En effet, chez ces souris l'expression d'une autre MAP, MAP1B, est de 2 fois supérieure à la normale à la naissance. MAP1B présente une fonction synaptique (Kawakami *et al.*, 2003 ; Benoist *et al.*, 2013 ; Tortosa *et al.*, 2011), pouvant expliquer cette compensation. Le niveau de MAP1B revient cependant à un niveau analogue à une souris normale à l'âge adulte à 12 mois (Dawson *et al.*, 2001; Fujio *et al.*, 2007 ; Harada *et al.*, 1994). Les conclusions de ces études des souris KO-tau restent donc assez variables. Une étude récente effectuée par Morris et collaborateurs (Morris *et al.*, 2013) a montré chez le même type de souris dont avait fait l'objet l'étude de Lei, l'obtention des mêmes effets mais de façon beaucoup moins marquée. Il est possible que la raison de la variabilité de ces découvertes soit due à la différence de fond génétique entre ces deux souris (Götz *et al.*, 2013). En raison de la compensation des fonctions de tau par les autres MAPs, qui partagent de nombreux rôles biologiques (Dehmelt et Halpain, 2004 ; Sontag *et al.*, 2012), le rôle précis de tau est complexe à étudier. Chez un modèle de nématode *C. Elegans*, il existe une seule protéine homologue de tau, PTL-1 (protein Tau-like 1). L'étude de ce modèle avec l'extinction ou la mutation de ce gène a mis en évidence l'importance de tau dans le développement normal des neurones, leur vieillissement et la durée de vie de l'organisme (Chew *et al.*, 2013 ; McDermott *et al.*, 1996). A l'échelle synaptique, l'extinction de l'expression de tau par ARN interférant induit la disparition des épines dendritiques (Chen *et al.*, 2012) montrant l'implication de tau dans la structure des synapses. De plus, l'étude des synaptosomes de souris KO-Tau par Ittner et collaborateurs a montré que les récepteurs NMDA étaient déstabilisés à la synapse, entraînant une diminution de ceux-ci à la PSD. Cette déstabilisation a été reliée à l'absence de Fyn. En diminuant la phosphorylation du résidu Tyr-1472 impliqué dans la stabilisation des récepteurs à la synapse (Trepanier *et al.*, 2012) et dans l'interaction avec PSD-95, l'ancrage des R-NMDA à la synapse est diminué et les récepteurs sont déstabilisés (Roche *et al.*, 2001). Ces données limitent le rôle synaptique de tau à un transporteur de la protéine de signalisation Fyn. Il est en revanche peu clair si tau y adresse d'autres protéines ou y incarne d'autres fonctions. Les études de modèles pathologiques impliquant la protéine tau viennent enrichir les connaissances de sa fonction par l'illustration de sa synaptotoxicité.

Chapitre 4 : La synaptotoxicité de tau

1. La synaptotoxicité de l'A β

Les oligomères d'A β qu'ils soient d'origine synthétique, secrétés par cellules surexprimant des formes mutées de l'APP humain ou extraits de cerveaux de patients atteints de MA, induisent une perte des synapses lorsqu'ils sont appliqués sur des cultures de neurones tandis que les monomères et les fibrilles sont relativement inertes (Lacor, 2004 ; Lambert *et al.*, 1998). Des études utilisant une approche électrophysiologique ont montré que ces oligomères causent des dysfonctionnements synaptiques ainsi qu'une altération de la LTP (Li *et al.*, 2009; 2011 ; Selkoe, 2008 ; Shankar *et al.*, 2007) et peuvent induire une facilitation de la LTD.

Parmi les hypothèses expliquant les effets A β sur les phénomènes de plasticités synaptiques, on retrouve la mise en avant de l'activation excessive des récepteurs NMDA extrasynaptiques qui seront activés par l'altération de la recapture du glutamate qui alors va déborder en dehors de la fente synaptique. L'utilisation d'un inhibiteur de la recapture du glutamate, le TBOA (DL-threo-beta-benzyloxyaspartate) montre un effet similaire en induisant de la LTD. Cependant, la co-application de TBOA et d'A β n'amplifie pas le phénomène, et l'A β agit comme un antagoniste à l'effet du TBOA. Ainsi, l'induction de la LTD par l'exposition aux A β induit une activation préférentielle des récepteurs contenant la sous-unité GluN2B, une population de récepteurs plus spécifiquement localisée au niveau extrasynaptique (Kervern *et al.*, 2012).

D'autres hypothèses mettent en avant le fait que l'A β induit l'internalisation des R-AMPA et R-NMDA (Hsieh *et al.*, 2006, Snyder *et al.*, 2005), celle-ci serait due à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire qui alors active la calcium-dépendante sérine-thréonine protéine phosphatase Calcineurin (Shankar *et al.*, 2007). D'autres études ont impliquées l'activation de différentes kinases dans l'effet des oligomères d'A β sur la plasticité synaptique comme GSK3 β , Cdk5 ou encore l'AMPK (Dolan et Johnson, 2010 ; Mairet-Coello *et al.*, 2013 ; Thornton *et al.*, 2011).

D'autres altérations fonctionnelles des synapses pourraient expliquer la réduction du potentiel de plasticité des synapses. Ainsi les changements au niveau des mitochondries synaptiques incluant l'altération de leur dynamique, leur transport et leur fonctionnement ont été aussi associés avec le dysfonctionnement et la perte synaptique dans les modèles surexprimant l'APP (Baliatti *et al.*, 2013). Ce phénomène peut être associé à des variations de la

concentration de calcium intracellulaire étant donné que les mitochondries sont essentielles dans sa régulation.

L'activation non apoptotique des caspases induite par l'A β pourrait également contribuer à la perte synaptique (D'Amelio *et al.*, 2010). Tous ces mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de synaptotoxicité allant de la dérégulation de l'homéostasie calcique, à l'altération fonctionnelle des mitochondries synaptiques, de dérégulation des kinases et d'activation des caspases impliquent exclusivement les formes oligomériques de l'A β . Certains liens apparaissent entre ces altérations, comme la dérégulation de l'homéostasie calcique qui semble être un évènement reliant certains de ces processus.

La dérégulation de la protéine tau est l'une des autres caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, et peu de connexions avaient été établies jusqu'ici entre le pan amyloïde et tau de la pathologie. Cependant, des études récentes ont montré que l'effet synaptotoxique de l'A β était aussi dépendant de la présence de la protéine tau (Roberson *et al.*, 2007), apportant de façon novatrice un lien entre l'aspect amyloïde et tau de la MA.

2. Les modèles de synaptotoxicité de tau

La toxicité neuronale des altérations de la protéine tau dans la MA a longtemps été attribuée à la DNF. Bien que nocifs, les enchevêtrements neurofibrillaires de tau ne représenteraient pas la forme la plus toxique liée à tau. Dans deux modèles de souris exprimant des mutations de MAPT reproduisant la tauopathie de type FTDP-17 (mutations P301S et Δ K280), il est apparu que la perte synaptique et la mort neuronale précédaient l'apparition de la DNF (Yoshiyama *et al.*, 2007 ; Eckermann *et al.*, 2007) incriminant ainsi les formes solubles de tau comme les formes les plus toxiques (Crimins *et al.*, 2013 ; Kopeikina *et al.*, 2011; 2012; 2013) plutôt que les formes agrégées.

2.1. La souris P301L

La mutation P301L est une modification du gène MAPT caractéristique d'une forme de FTDP-17. Cette mutation correspond au remplacement de la proline initiale en 301 par une leucine, acide aminé acide. Du fait de cette propriété, on lui attribue le caractère de phospho-mutant, car il mime l'acidité d'une phosphorylation. Dans des cultures de souris transgéniques rTg4510 porteuses de la mutation P301L, il a été montré que tau était retrouvé dans les épines dendritiques. De façon intéressante, une étude a rapporté que la souris P301L présente une LTP augmentée par rapport aux souris contrôles à 9 semaines (Boekhoorn, 2006). De plus,

une autre étude plus récente de la même équipe a montré que la densité synaptique chez cette souris est augmentée dans le cortex, démontrant que la tau humaine promeut la genèse des épines dendritiques (Kremer *et al.*, 2011). La toxicité de tau a été illustrée dans des modèles de souris P301L ou P301S qui présentent des altérations de la LTP à partir de 4,5 mois et 6 mois respectivement sans présence de DNF (Kopeikina *et al.*, 2013; Yoshiyama *et al.*, 2007) et une réduction des performances à différents tests de mémoire spatiale (Hoover *et al.*, 2010).

Au niveau protéique, les déficits cognitifs de la souris P301L se produisent en parallèle d'une forte diminution synaptique des récepteurs AMPA (sous-unités GluA1 et GluA2), mais également du R-NMDA, (sous unité GluN1) et d'une augmentation de tau synaptique. L'hypothèse développée par Hoover et collaborateurs est que la localisation anormale de tau liée à des changements de phosphorylation induit des déficits synaptiques par défaut d'adressage des récepteurs à la membrane ou par un défaut d'ancrage de ces derniers, induisant une réduction de l'amplitude et de la fréquence des courants AMPA. La transfection de formes de tau mutées, combinant une mutation P301L et une construction de type tauA (Les sites Thr 111, 153, 175, 181, 205, 212, 217, 231 et Ser 199, 202, 235, 396, 404, 422 étant remplacés par des Alanines), montrent l'absence de tau dans les épines, et un retour des courants AMPA normaux dans les neurones hippocampiques (Hoover *et al.*, 2010) comparés à de simples cultures transfectées P301L. Cette forme tauA mime une forme de tau non phosphorylée sur ces sites montrant ainsi que le rôle synaptotoxique de tau est dépendant des sites phosphorylables dirigés vers les prolines. Ces données sur les modèles P301L révèlent l'importance de la phosphorylation de tau dans sa localisation synaptique et son rôle synaptotoxique.

2.2. Propagation trans-synaptique de tau

Deux travaux récents (Liu *et al.*, 2012 ; de Calignon *et al.*, 2012) montrent que l'expression de la forme pathologique P301S de tau exprimée seulement dans une partie du cortex enthorinal (EC-2) pouvait se propager aux régions voisines. Cette propagation s'effectue par la connexion des neurones exprimant la forme mutée avec ceux des régions voisines de façon trans-synaptique. A 24 mois, 97% des neurones du cortex enthorinal présentant un marquage positif à la tau pathologique ne présentent aucune expression du transgène, illustrant que la présence de la tau pathologique est dû à une propagation et non à une expression endogène. De plus, le même type de résultat a été obtenu sur les cellules astrocytaires présentant un

marquage positif à la DNF, sans pour autant présenter d'expression du transgène, illustrant une capture de tau par les astrocytes en provenance de la terminaison axonale.

Afin d'expliquer ce trafic de tau trans-synaptique, plusieurs études ont investigué la possibilité que tau soit transmise par voie vésiculaire. La protéine tau ne possédant pas de peptide de signalisation par voie sécrétoire (Lee *et al.*, 2012), la piste la plus prometteuse est celle des exosomes (Nickel et Rabouille, 2008 ; Chivet *et al.*, 2013). En effet, la protéine tau a été identifiée à la fois dans des exosomes de lignées cellulaires surexprimant tau, mais aussi dans ceux issus d'une purification de liquide cérébro-spinal de patients atteints de MA (Saman *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent donc que tau peut être excrété au niveau synaptique puis capturé au niveau post-synaptique ou somato-dendritique (Wu *et al.*, 2013) et ensuite exprimer une fonction synaptotoxique. Les formes toxiques de tau s'accumuleraient alors dans le compartiment synaptique comme montré par exemple dans l'étude des cerveaux de patient atteints de MA (Tai *et al.*, 2012).

Ces résultats suggèrent que la propagation de la pathologie tau passerait par un mécanisme de transfert trans-cellulaire avec un rôle déterminant de l'état de phosphorylation de tau dans la fonction et la répartition de cette protéine.

3. La souris APP

La perturbation de la phosphorylation de tau est un des événements majeurs que l'on retrouve dans la MA. Roberson et collaborateurs en 2007 ont montré que, chez un modèle de souris de MA portant une mutation Sweddish (K670M/N671L) et Indiana (V717F) sur l'APP, lorsque l'expression de tau est éteinte, la synaptotoxicité induite par la présence des A β est considérablement diminuée (Roberson *et al.*, 2007).

Une autre étude plus récente menée par Ittner et collaborateurs en 2010 s'est penchée sur le rôle synaptotoxique de tau en croisant des souris KO-tau, APP swedish, et des souris exprimant une forme tronquée de tau dépourvue de son domaine d'association aux microtubules. Leurs résultats mettent en évidence la présence de tau dans le compartiment synaptique chez la souris sauvage. Ils montrent ainsi que l'extinction de tau ou l'expression de la forme tronquée de la protéine tau (Δ tau74) ou encore la combinaison KO-tau- Δ tau74 fait perdre cette localisation synaptique de tau, réduit considérablement les déficits cognitifs de la souris APP et améliore sa survie. Bien que les mécanismes de cette toxicité ne soient pas encore élucidés, la synaptotoxicité de tau a été liée à son rôle dans la translocation synaptique

de fyn. Ils proposent que l'action de fyn au niveau post-synaptique par phosphorylation des R-NMDA soit à l'origine d'une hyperactivation anormale de ces récepteurs conduisant à une cascade excitotoxique responsable de la synaptotoxicité observée dans cette pathologie. Ainsi, une augmentation de tau à la synapse se traduit par une augmentation de fyn et donc de l'amplification de ces phénomènes (Figure 15).

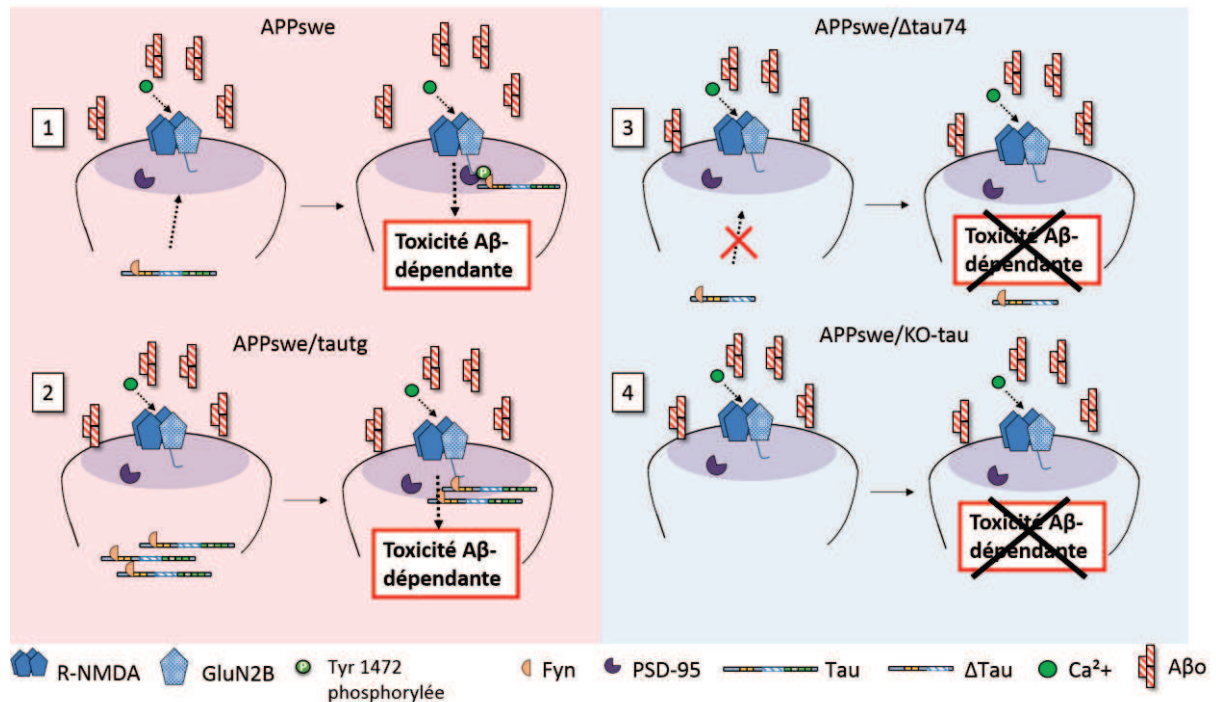


Figure 15: Modèle décrivant les mécanismes synaptotoxiques de tau proposé par Ittner et Götz. Chez la souris APP, tau est anormalement phosphorylée et se délocalise à la synapse complexée à fyn pour interagir avec les R-NMDA. Fyn phosphoryle la tyr1472, permettant à PSD-95 d'interagir avec les R-NMDA ce qui déclenche une cascade excitotoxique (1). Chez la souris double transgénique APP^{Swe}/tautg (pR5-P301L), une quantité plus importante de tau va à la synapse amplifiant le phénomène (2). Chez les souris APP^{Swe}/Δtau74 (3) ou chez la souris APP^{Swe}/KO-tau (4), l'absence du domaine d'association aux microtubules ou l'absence de tau n'induit plus la toxicité liée à l'Aβ, tau ne peut donc plus se rendre à la synapse ni y apporter fyn, empêchant ainsi l'activation de la cascade excitotoxique. D'après Ittner et Götz, 2010).

Ainsi, la relation entre Aβ et tau est démontrée. L'Aβ agit non seulement sur l'état de phosphorylation de tau mais aussi sur sa localisation. Deux études menées par Zempel et collaborateurs sur des cultures primaires de neurones montrent que les oligomères d'Aβ induisent une augmentation de la phosphorylation de tau, mais aussi une délocalisation dendritique importante et une déstabilisation des microtubules (Zempel *et al.*, 2010; 2013). Ces résultats ne montrent pas une implication directe de tau à la synapse, mais suggèrent que l'Aβ et de tau exercent un rôle synergique dans la synaptotoxicité.

Ces études montrent donc l'importance de tau dans les mécanismes synaptotoxiques liés à la pathologie amyloïde. La compréhension de l'action combinée des A β et de tau constitue véritablement un enjeu pour la recherche. On ne peut désormais attribuer les mécanismes délétères seulement à la protéine tau ou au peptide amyloïde, mais bien à leurs actions synergiques combinées.

Objectifs

Dans ce travail de thèse, les objectifs sont dans une première partie la mise en évidence des mécanismes physiologiques qui amènent la protéine tau à la synapse et comment sont-ils affectés par le peptide β -amyloïde. Dans une deuxième partie, l'objectif est d'étudier l'impact du peptide β -amyloïde sur le cytosquelette d'actine, très présent au niveau synaptique.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative caractérisée par une perte synaptique et une mort neuronale. L'atteinte synaptique est un des événements précoces de cette pathologie et les mécanismes liés à cette synaptotoxicité n'ont pas encore été à ce jour tous élucidés. L'une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer est qu'elle présente deux marques histopathologiques spécifiques, la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles qui sont issus d'une dérégulation du métabolisme et de la physiologie de la protéine tau et du peptide β -amyloïde respectivement.

Actuellement, il est admis que les formes solubles de ces protéines sont à l'origine des événements précoces d'altérations synaptiques, et leurs actions conjointes sont responsables de la pathologie. Ce pan de la MA fait actuellement l'objet de nombreuses recherches. La récente description de la protéine tau au niveau synaptique a été mise en relation avec l'activité des récepteurs NMDA attestant d'une implication dans les mécanismes physiologiques (Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012).

Ce travail se décompose en deux parties. La partie principale consiste à mieux comprendre comment la protéine tau se déplace vers le compartiment synaptique et sous quelles conditions. De plus, ce travail vise à étudier les mécanismes par lesquels l'A β affecte la protéine tau au niveau synaptique.

La deuxième partie de cette étude s'est concentrée sur la compréhension des mécanismes de dérégulation de l'actine par l'A β et sur la possible interaction qui existe entre l'actine filamenteuse et ce peptide.

Nous utilisons une variété de modèles expérimentaux du niveau moléculaire à l'échelle de l'organisme à l'aide de systèmes purifiés, de cultures primaires de neurones corticaux et l'utilisation de modèle *in vivo* et *ex-vivo* permettant de répondre à ces questions par différentes approches complémentaires.

Partie 1 : La dynamique de tau dans la synapse et sa perturbation par les oligomères d'A β

1. Objectifs

La protéine tau est une protéine d'association aux microtubules et possède diverses fonctions biologiques. Récemment, une nouvelle fonction lui a été attribuée, celle de protéine synaptique (Ittner *et al.*, 2010). Cependant, son rôle exact dans ce compartiment reste encore peu décrit et peu connu.

Les modèles expérimentaux de tauopathies ont apporté la preuve de l'implication synaptique de tau dans les processus délétères retrouvés dans ces pathologies. Les études sur la souris transgénique portant la mutation P301L montrent que la seule dérégulation de tau implique une cascade d'évènements synaptotoxiques conduisant au phénotype pathologique d'altération de la mémoire (Hoover *et al.*, 2010).

Dans le cas de la MA, la dérégulation de tau est liée à la présence des oligomères d'A β . Ces oligomères affectent les voies de signalisations régulant tau, conduisant au gain de fonction toxique de cette dernière et ainsi, participent tous deux à la cascade synaptotoxique rencontrée dans la MA (Roberson *et al.*, 2007 ; Ittner *et al.*, 2010 ; Zempel *et al.*, 2010).

Dans ce cadre, l'analyse des mécanismes de l'altération synaptique dépendante de tau a révélé l'implication d'autres acteurs : les récepteurs NMDA et fyn. Tau influence indirectement leur interaction conduisant à cette toxicité. C'est l'étude de cette fonction toxique qui a permis d'identifier la localisation synaptique de tau chez les souris sauvages et sa fonction de transporteur de fyn.

Il est important de noter que la présence de fyn à la synapse est requise pour la mise en place de la LTP (Grant *et al.*, 1992). Dans ce compartiment, fyn interagit avec les récepteurs NMDA, induit leur stabilisation et affecte leur courant (Trepanier *et al.*, 2012). Tau, en tant que transporteur de fyn, possède donc un rôle synaptique. La mise en lumière de ces données apporte quelques éléments indiquant que tau possède non seulement un rôle synaptotoxique mais semble également être impliqué dans les processus synaptiques physiologiques.

Au regard de ces données, mon travail s'est focalisé sur l'étude de l'implication synaptique de tau ainsi que sur les modalités et les mécanismes régissant son recrutement aux épines. De plus, ce travail s'est porté sur ces mêmes mécanismes, mais accompagné du pan amyloïde de la MA

afin de comprendre comment la protéine tau est dérégulée et comment elle va acquérir des fonctions toxiques.

2. Résultats

Les résultats de ces travaux sont présentés dans le document faisant actuellement l'objet d'un article soumis pour publication.

Activity dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to Amyloid β oligomers.

Marie Lise Frandemiche^{a,b}, Sandrine De Seranno^{a,b}, Travis Rush^{a,b}, Auréliane Elie^{b,c}, Isabelle Arnal^{b,c}, Fabien Lanté^{a,b} and Alain Buisson^{a,b}

a : INSERM, U836, Equipe 12, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

b : Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

c : INSERM, U836, Equipe 13, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

Activity dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to Amyloid β oligomers

Marie Lise Frandemiche^{a,b}, Sandrine De Seranno^{a,b}, Travis Rush^{a,b}, Auréliane Elie^{b,c}, Isabelle Arnal^{b,c}, Fabien Lanté^{a,b} and Alain Buisson^{a,b}

a : INSERM, U836, Equipe 12, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

b : Université Joseph Fourier, Grenoble Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

c : INSERM, U836, Equipe 13, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

Tau is a microtubule-associated protein well-known for its stabilization of microtubules in axons. Recently, it has emerged that tau participates in synaptic function as part of the molecular pathway leading to A β -driven synaptotoxicity in the context of Alzheimer's disease (AD). Here, we report the implication of tau in the profound functional synaptic modification associated with synaptic plasticity. By exposing cultured cortical neurons to a pharmacological synaptic activation, we induced translocation of endogenous tau from the dendritic to the post-synaptic compartment. We observed similar tau translocation to the post-synaptic fraction in acute hippocampal slices subjected to long-term potentiation (LTP). When we performed live confocal microscopy on cortical neurons transfected with human-tau-GFP, we visualized an activity-dependent accumulation of tau in the post-synaptic density. Co-precipitation using phalloidin revealed that tau interacts with the most predominant cytoskeletal component present: filamentous actin. Finally, when we exposed cortical cultures to 100 nM of Human synthetic A β oligomers (A β o) for 15 min, we induced mislocalization of tau into the spines under resting conditions and abrogated subsequent activity-dependent synaptic tau translocation. These changes in synaptic tau dynamics may rely on a difference between physiological and pathological phosphorylation of tau. Together these results suggest that intense synaptic activity drives tau to the post-synaptic density of excitatory synapses and that A β o-driven tau translocation to the spine deserves further investigation as a key event toward synaptotoxicity in neurodegenerative diseases.

Introduction

Fibrillar deposits of phosphorylated tau are a characteristic feature of several neurodegenerative diseases including Alzheimer's diseases (AD). Increasing evidence suggests that the presence of neurofibrillary tangles do not cause direct neuronal dysfunction, rather that alterations to physiological tau functions may be key to diseases processes (for review, see (Jaworski et al., 2010; Morris et al., 2011). Tau is a highly soluble protein with a predominant expression in neurons (Trojanowski et al., 1989). A large proportion of tau is axonal where it interacts with microtubules (MT) through its C-terminal microtubule-binding domain to promote MT polymerization and stabilization (for review, see Götz et al., 2013). Accordingly, tau exerts a critical role in the regulation of microtubule-dependent axonal transport. More recently, numerous studies have revealed novel functions for tau including an implication in neuronal signaling pathways, DNA protection and synaptic regulation. These studies were based on the identification of tau interaction with novel molecular partners such as DNA or RNA (Loomis et al., 1990); (Sultan et al., 2011), neuronal membranes (Pooler et al., 2012) and synaptic located proteins such as Fyn or PSD-95 (Ittner et al., 2010; Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Subsequently, the association of tau with synaptic proteins has raised the intriguing possibility that tau exerts physiological roles in the synapse and that altered tau function may be involved in the synaptic dysfunction that precedes synaptic loss common across neurodegenerative tauopathies.

Though post-synaptic localization of tau was initially identified under pathological conditions (Hoover et al., 2010), there are several lines of evidence that suggest the involvement of tau in physiological synaptic functions. In 2010, Ittner et al. described that the presence of tau in the post synaptic compartment mediates the targeting of src family kinase, fyn, to glutamatergic NMDA receptors. More recently, Chen et al (Chen et al., 2012) suggested that tau participates in spine edification by demonstrating that reduction of tau expression results in synapse loss. Together, these data are consistent with a functional role for tau in the physiological activation of excitatory synapse.

Dendritic spines are small protuberances observed on the dendrites that are the physical support of post-synaptic sites of excitatory synapses. They are enriched in neurotransmitter receptors, specific scaffolding proteins and display an abundant actin cytoskeleton responsible for spines morphology (for review see Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Under specific activation

patterns, spines undergo profound and long-lasting modifications of morphology and synaptic strength that together, underlie synaptic plasticity. Synaptic dysfunction is the best correlate of the cognitive decline that characterizes AD, and tau has been implicated in this synaptotoxic effect triggered by A β oligomers exposure. With the emergent idea that tau could penetrate into the synaptic compartment, we investigated the mechanisms of tau recruitment to the spines under synaptic activation and A β o exposure. To monitor tau localization, we used sub-cellular fractionation of both ex-vivo (i.e. acute hippocampal slice) and in vitro (i.e. cultured cortical neurons) subjected to an electrophysiological or chemical long-term potentiation (LTP). In parallel, we monitored GFP-tagged tau coupled with dynamic fluorescence imaging.

Material & methods

Primary cultures of cortical neurons

Mouse cortical neurons were cultured from 14- to 15-day embryos as described previously (Leveille et al., 2008). Cerebral cortices were dissected, dissociated, and cultured in Dulbecco's modified eagle medium containing 5% foetal bovine serum, 5% horse serum, and 2 mM glutamine (all from Sigma Saint Quentin Fallavier, France) on 24-well plates (Falcon Becton Dickinson labware Europe, Meylan, France) for biochemical experiments. Neurons were seeded on 35 mm glass-bottom dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) at final concentration of two cortical hemispheres per dish for confocal experiments. All plates, dishes and coverslips were coated with 0.1 mg/ml poly-D-lysine and 0.02 mg/ml laminin (Sigma). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ - 95% air. After 3–4 days in vitro (DIV), cytosine arabinoside (AraC 10 μ M, Sigma) was added to inhibit proliferation of non-neuronal cells in cultures used for biochemistry experiments, 98% of the cells were considered as neuronal. The day before the experiments, cells were washed into DMEM. Treatments were performed on neuronal cultures at 14-15 DIV.

Neuronal Transfection

Transfections were performed on cortical neuron cultures after 12 DIV with calcium phosphate precipitation. Growth medium (DMEM and serums) is removed and kept until the last step of transfection. Cells were washed into DMKY for 1-1.5 hours (in mM: kynurenic acid 1, phenol red 0.05%, NaOH 0.9, HEPES 0.5, MgCl₂ 10 pH: 7.4). 3.5 μ g of plasmids, pEGFP-Tau 2N4R (full-length human nervous system tau) and LifeAct-RFP, a peptide that specifically interacts with filamentous actin (Riedl et al., 2008) were mixed with CaCl₂ (120 mM) in HBS (in mM: HEPES 25, NaCl 140, Na₂HPO₄ 0.750, pH=7.06) and left for 20 minutes to precipitate the

DNA. Plasmids were then applied to cells for 30 min. Transfection media was replaced with conditioned growth medium and cultures were returned to the incubator until use at DIV 14-15.

Fluorescence recovery after photobleaching experiments

Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) was performed on cultured neurons 48 h after transfection. Images were acquired with an inverted Nikon Eclipse Ti C2 confocal microscope with Nikon 60X water objective with a 1.33 numerical aperture. EGFP-tau was bleached at 405 nm and the fluorescence recovery was measured for 80 seconds (at 1 s/frame). Fluorescent signal analysis was performed with Nikon software Nis.

Time-lapse Imaging of transfected neurons

Transfected neurons were placed in HBBSS solution (in mM: NaCl 0.110, KCl 0.005, CaCl₂ 2, MgSO₄ 0.0008, NaH₂PO₄ 1, HEPES 12, D-Glucose 5, NaHCO₃ 25, glycine 0.01. All from Sigma) 1.5-2 hours before experiment. Neurons were imaged with a Zeiss LSM 710 confocal imaging system using a 63x oil immersion objective and ZEN 2010 software. Z-stacks were 0.61 μm per step, (1 pixel= 0.134 μM) with a 1 AU pinhole: 84 μm. Images were collected immediately before, 15 and 30 minutes after treatment. Evolution of the fluorescence within spine heads in maximum projection was analyzed with Metamorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). 20-40 spines per neurons were followed throughout treatment for each experiment.

Slice preparation

Hippocampal slices were prepared from 2 to 4 months-old OF1 mice. Mice were cervically dislocated and immediately decapitated. Their hippocampi were dissected out and 400 μm thick transverse slices were cut in ice-cold cutting solution (in mM: KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 10, CaCl₂ 0.5, NaHCO₃ 26, Sucrose 234, and Glucose 11, saturated with 95% O₂ and 5% CO₂) with a Leica VT1200 blade microtome. After the dissection, slices were kept in oxygenated Artificial Cerebro-Spinal Fluid (ACSF ; in mM NaCl 119, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 1.3, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 26, and Glucose 11), at a temperature of 27± 1 °C for at least 1 hour.

Electrophysiology recordings

Slices were visualized in a chamber on an upright microscope with transmitted illumination and continuously perfused at 1 ml/min with the same oxygenated ACSF at 27± 1 °C. Stimulating

electrodes (bipolar microelectrodes) were placed in the stratum radiatum to stimulate the Schaffer Collaterals pathway. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the stratum radiatum using a recording glass pipette filled with ACSF and amplified with an Axon Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Data were digitized through an Axon Digidata 1440A and acquired with pCLAMP 10 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The initial slope of the fEPSPs was measured to avoid population spike contamination. For LTP experiments, test stimuli (0.2 msec pulse width) were delivered once every 15 seconds, and the stimulus intensity were setted to give baseline fEPSP slopes = 50% of maximal evoked slopes.

Slices that showed maximal fEPSPs sizes <1 mV were rejected. LTP was induced by applying 4 trains of 100 stimuli at 100 Hz with an inter-train interval of 5 minutes. CA1 slices were frozen in liquid nitrogen at the end of experiment for subsequent biochemical analyses.

Purification of tau

His-tagged human Tau (1N4R Tau-412 isoform) plasmid was kindly provided by Dr. N. Sergeant (Lille, France). Recombinant Tau was purified from *E.Coli* BL21 (Invitrogen) on Talon metal affinity resin (Clontech, Saint-Germain en Lay, France) according to the manufacturer instructions. The protein was further processed by a size exclusion chromatography in BRB80 buffer (in mM : Pipes 80, EGTA 1, MgCl₂ 1, pH 6.8), concentrated and ultracentrifuged at 230,000 x g for 10 min. The protein was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Protein concentrations were determined by a Bradford assay (Sigma) using BSA as a standard.

In Vitro Co-sedimentation Assays

Actin co-sedimentation assays were performed with purified human platelet actin (Cytoskeleton Inc., Denver, Co, USA) resuspended in buffer G (in mM: Tris 2 pH8.0, ATP 0.2, DTT 0.5, CaCl₂ 0.1). 5µM G-actin was polymerized 1 h at room temperature in the absence or in the presence of 1 µM Tau in buffer G supplemented with in mM: KCl 50, MgCl₂ 1, EGTA1, imidazole 10 at pH 7.5. The 20 µl-reaction mixtures were then centrifuged either for 15 min at 100,000x g or for 10 min at 15,000 x g. At low-speed centrifugation, filamentous actin remains in the supernatant and only F-actin bundles are pelleted, whereas the high-speed centrifugation precipitates all F-actin forms. Supernatants and pellets fractions were recovered and subjected to 10 % SDS-PAGE gel followed by Coomassie-Blue staining.

Sub-cellular fractionation

Cultured neurons or hippocampal CA1 slices were homogenized in cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.4. Samples were maintained at 4°C during all steps of the experiment. Homogenates were cleared at 1,000g for 10 min to remove nuclei and large debris. The resulting supernatants were concentrated at 12,000g for 20 min to obtain a crude membrane fraction which was resuspended twice (HEPES 4 mM, EDTA 1 mM, pH 7.4, 20 min at 12,000g). Then, the pellet was incubated (HEPES 20 mM, NaCl 100 mM, 0.5% Triton X-100, pH 7.2) for 1h at 4°C of mild agitation and centrifuged at 12,000g for 20 min to pellet the synaptosomal membrane fraction. The supernatant was collected as the non-postsynaptic density membrane fraction (Non-PSD) or Triton-soluble fraction. The pellet was then solubilized (HEPES 20 mM, NaCl 0.15 mM, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 1% SDS, pH 7.5) for 1 h at 4°C and centrifuged at 1,0000g for 15 min. The supernatant contained the PSD or Triton-insoluble fraction. The integrity of Non-PSD was verified by immunoblotting for synaptophysin, which was enriched in the non-PSD fraction, and the PSD fraction was confirmed by the immunoblotting of PSD-95 enriched in this compartment.

A β oligomerization and fibrillogenesis

Recombinant A β 1-42 peptide (Bachem, Bubendorf, Switzerland) was resuspended in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to 1 mM until complete re-suspension as described in (Stine, 2003). A β oligomers (A β o) were prepared by diluting A β to 1 mM in DMSO then to 100 μ M in ice-cold HEPES and Bicarbonate-buffered saline solution (HBBSS) with immediate vortexing and bath sonication and then incubated at 4°C for 24 h with mild agitation.

Synaptic activation and actin cytoskeleton disruption

Cultures were placed in DMEM 24h before the experiment. Synaptic activation was induced at 37°C with 50 μ M bicuculline, a GABA α receptor antagonist and 2.5 mM 4-Amino-pyridine, a weak potassium channel blocker (all from Tocris, Bristol, UK) for 15 min (Leveille et al., 2008). Actin stabilization was induced by jasplakinolide (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) application at 1 μ M (Lazaro-Dieguez et al., 2008).

Immunoprecipitation

After treatment, primary neurons were rapidly transferred on ice to remove the media and immediately extracted with fresh buffer (100 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaH₂PO₄, pH 7.2, 2 mM ATP, 2 mM MgCl₂, phosphatase and protease inhibitor cocktail (Sigma, Saint Quentin

Fallavier, France). Equal amounts of protein were incubated with biotin-XX-phalloidin (Molecular probes, Eugene, OR, USA) 0.45 unit/condition with gentle rocking for 1 hr at room temperature. Thereafter, Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen Grand Island, NY, USA) were added to the complex formed by filamentous actin-biotin-XX phalloidin and incubated for 30 min at room temperature using gentle rotation. The actin-coated beads were separated with a magnet for 2-3 min, washed several times in the buffer and boiled in loading buffer 1X (Tris 124 mM, SDS 2%, glycerol 10%, β -mercaptoethanol 1%, and bromophenol blue 1%) for 5 min. Samples were stored at -20°C until used.

Immunoblotting

Samples in loading buffer were boiled for 5 min and equal amount of proteins (5-10 μ g) were resolved on a 4-12% or 4–20% gradient Bis-Tris polyacrylamide precast gels (BioRad, Marne-la-Coquette France) in denaturing conditions. Proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, France) for 2 hours at 4°C. Membranes were blocked with Tris-buffered saline (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.01% Tween-20, 5% nonfat dry milk for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies tau (1:50,000 dilution, A0024 Dako, Glostrup Denmark), tau phospho serine 404, tau phospho tyrosine 205 (1:1,000 dilution, PA1-14422, PA1-14426, PA1-14415 Thermo scientific, MA, USA) actin (1:2,000, A2066, Sigma), GluA1, GluN2B, GluN2A, synaptophysin (1:1,000 dilution, A1504, MAB5778, 04-901, MAB368 Milipore, MA, USA), Fyn (1:500 dilution, 15-sc-434 Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), PSD-95 (1:1,000 dilution, clone 6G6-1C9 ab2723 AbCam, Cambridge, UK). Membranes were incubated with the HRP-conjugated secondary antibodies (1:40,000 rabbit; 1:5,000 mouse, Sigma) for 45 min at room temperature. Specific proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence ECL detection system (BioRad, Marne la Coquette, France). Chemiluminescence detections were performed with the Biorad Chemidoc system and analyzed with the software Imagelab (BioRad, France).

Statistics

Results are expressed as the mean +/- SEM from independent biological samples. Statistical analyses were performed with Graphpad 6.0 Software (La Jolla, CA, USA) by two-way ANOVA followed by Bonferroni test for confocal analysis, one-way ANOVA for phalloidin precipitation analysis and Student t-test for Western blot analysis.

Results

Axonal and dendritic localization of Tau in primary cortical neurons under resting conditions

To characterize the localization of tau in cultured neurons under resting conditions (14 DIV), we transfected full length tau 2N4R-EGFP and LifeAct-RFP the latter of which encodes a small 17-amino-acid peptide that binds specifically to filamentous actin (Riedl et al., 2008). In neurons, filamentous actin is known to be enriched to the synaptic compartment (Star et al., 2002). By using LifeAct-RFP instead of Actin-GFP, we maintained actin stoichiometry. We first verified the localization of LifeAct-RFP in the synaptic compartment by co-transfecting a synaptic scaffold protein PSD-95-YFP. The merged image showed that filamentous actin and PSD-95 are both localized in dendritic spines (Fig 1A). We then co-transfected LifeAct-RFP, with EGFP-tau in cortical neurons and observed that EGFP-tau fluorescence is restricted to axonal and dendritic shaft in resting condition (Fig 1B). Only a minimal number of spines displayed traces of EGFP-tau (Fig 1B).

Synaptic activation induces translocation of tau to the synaptic compartment

In order to see how and under which circumstances tau enters into the post-synaptic compartment, we monitored EGFP-tau fluorescence under various conditions. First we induced a long-lasting synaptic activation by exposing cultured cortical neurons to bicuculline (Bic, 50 μ M), a GABAergic antagonist in the presence of 4-aminopyridine (4-AP, 2.5 mM), a weak potassium channel blocker which prevents neuronal repolarization (Leveille et al., 2008) for 30 min (Fig 2A). As early as 15 min after the beginning of the treatment, we measured an increase in EGFP-tau fluorescence in dendritic spines from 0 ± 0.04 to 0.52 ± 0.06 which stabilized after 30 min to 0.64 ± 0.05 (Fig 2 B, $p < 0.0001$ ***, 2 WAY ANOVA Bic/4-AP: N=5, n=162; Ctrl N=3, n=40 spines) and co-localized with LifeAct-RFP fluorescence. In contrast, the evolution of EGFP-tau fluorescence during a 30 min vehicle application showed no detectable change (Fig 2 B). Recognizing that plasmid-driven expression of EGFP-tau may modify tau cellular distribution, we studied the localization of endogenous tau in neurons subjected to synaptic activation. Western blot analysis of tau from total neuronal lysate showed no change after 15 and 30 min Bic/4-AP application (Fig 2C). Then, we isolated the non-PSD fraction (i.e Triton-soluble fraction) from the PSD-enriched fraction (i.e Triton-insoluble fraction) and audited the presence of synaptophysin and PSD-95 in each to verify the fractionation protocol. As expected, synaptophysin appeared only in the non-PSD fraction, and PSD-95 only in the

PSD-enriched fraction. Next, we performed western blot analysis of several synaptic proteins to assess the effect of our stimulation protocol (Fig 2D). No change in tau expression was detected in the non-PSD fraction. In contrast, tau expression in the PSD fraction showed a small amount in resting conditions which increased 1.5 fold after 15 min of synaptic activation (Fig 2E) (student t-test two-tailed ctrl 20.62 +/- 1.235 vs Bic/4-AP 30.92 +/- 1.799*** $p < 0,0001$, N=13 independent cultures). On the same PSD positive fractions, we analyzed the variation of synaptic markers that have been identified as potential tau interacting partners (Lee et al., 1998); (Ittner et al., 2010); (Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Following synaptic activation, we detected increases in PSD-95 (Fig 2E, student t-test two-tailed, ctrl 19.10 +/- 2.557 vs Bic/4-AP 26.9 +/- 1.894 * $p = 0.0249$, N=9) and the src family tyrosine kinase, Fyn (Fig 2E, student t-test two-tailed, ctrl 19.42 +/- 1.337 vs Bic/4-AP 26.54 +/- 1.130 ** $p = 0.0023$, N=6). The AMPA receptor subunit GluA1 which is recruited to the membrane during synaptic plasticity (Malinow and Malenka, 2002), was also increased in the PSD fraction (Fig 2E) (student t-test two-tailed, ctrl 18,84 +/- 1,930 vs Bic/4-AP 28,63 +/- 1,95 ** $p = 0.0026$, N=9). The actin cytoskeleton is highly reorganized during synaptic activation, as described previously (Star et al., 2002). Here, we saw an increase in actin content restricted to the PSD fraction (Fig 2E) (student t-test two-tailed, ctrl 22.18 +/- 1.913 vs Bic/4-AP 29.62 +/- 1.517 * $p = 0.0101$, N=7 independent cultures). Thus, during a long-lasting synaptic activation, we observed an increase in tau, fyn, actin, GluA1 and PSD-95 content in the PSD-positive fraction, consistent with the characteristic features of synaptic plasticity (Ehlers, 2003). These results suggest that tau translocates from the dendritic shaft to the synapse during activation, and probably takes part in the activity-driven synaptic reorganization that underlies synaptic plasticity. In order to generalize these findings, we chose to confirm these results in an ex-vivo model of synaptic plasticity: long term potentiation (LTP) in hippocampal slices (Fig 3A). We performed synaptosomal fractionation of microdissected CA1 regions taken from potentiated hippocampal slices. We observed a similar LTP-induced increase in tau content within the PSD enriched fraction from CA1 synaptosomes (Fig 3B) (29.86 +/-4.86 to 70.15 +/- 4.86 ** $p = 0.0011$). As expected, actin and GluA1 were also increased (34.31 +/- 2.518 to 64.92 +/-2.518 *** $p = 0.0002$, 34.31 +/- 8.15 to 65.70 +/-8.15 * $p = 0.0346$) strengthening the idea that tau is involved in synaptic reorganization processes necessary for synaptic plasticity (Fig 3C).

Tau interacts with filamentous actin in the synapse

While initially described as a microtubule associated protein (MAP), tau has been shown to interact with other molecular partners which appear in the PSD fraction such as fyn or PSD-95

(Ittner et al., 2010 ; Mondragon-Rodriguez et al., 2012). Among several synaptically located proteins, actin is of particular interest for its potential capacity to interact with human tau (Fulga et al., 2006 ; He et al., 2009 ; Yu, 2006). We investigated whether tau interacts with actin, the most predominant cytoskeleton element of the synapse. Purified G-actin was polymerized with 1N4R tau isoform and centrifuged at 100,000 G (Fig 4A) or 15,000 G (Fig 4B). We found that tau co-precipitated with the pellet obtained from high and low speed centrifugations illustrating its direct interaction with both filamentous actin (F-actin; Fig 4A) and actin bundles (Fig 4B). Similarly, a phalloidin precipitation of neuronal lysate, which selectively collected the neuronal F-actin and its binding partners, revealed the presence of tau by western blotting. This result illustrates that tau interacts with F-actin in neurons (Fig. 5A). Following synaptic activation, we observed an increase in the amount of F-actin harvested (Fig 5B), (student t-test two-tailed ctrl 17.67 +/- 2.08; Bic/4-AP 31.76 +/- 1.882 ***p=0.0003 N=7 independent cultures) and a concomitant increase in tau (ctrl 16.91 +/- 1.843; Bic/4-AP 31.49 +/- 2.028 ***p=0.0002 N=7 independent cultures). These results show that the amount of tau collected is proportional to neuronal F-actin content, suggesting a close link between F-actin and tau. Next, we studied the impact of pharmacological manipulations of actin organization on synaptic EGFP-tau fluorescence localization. For this purpose, we treated our primary cortical neurons with jasplakinolide (1 μ M), a compound that promotes actin polymerization (Lazaro-Dieiguez et al., 2008), or with a latrunculin A (at 500 nM), a compound that depolymerizes F-actin into soluble globular actin (G-actin) (Coué et al., 1987) (Fig 5C). Following jasplakinolide application, we observed a large increase in synaptic EGFP-tau fluorescence (Fig 4D: $\Delta F/F_0$, 0.64 +/- 0.05 after 15 min, 0.59 +/- 0.06 after 30 min, ANOVA 2 WAY ***p<0.0001, ctrl n=40 N=3; Jasplakinolide n=106, N=4). Latrunculin treatment produced rapid actin depolymerization and the corresponding disappearance of LifeAct-RFP fluorescence in every spine studied; no synaptic EGFP-tau fluorescence was observed (data not shown).

We analyzed actin and tau in the PSD-enriched fraction from primary cortical neurons treated with jasplakinolide (Fig 5E). We observed that increased neuronal F-actin content promotes concurrent tau enrichment (Fig 5F, student t-test two-tailed Ctrl 17,49 +/- 0,7755 vs Jaspla 27,02 +/- 2,719 *p=0.0150, N=4 independent culture). GLUA1, whose trafficking to the membrane is known to be actin-dependent, was increased (Student t-test two-tailed Ctrl 16,91 +/- 1,015 vs Jaspla 31,00 +/- 4.778 *p=0.0279, N=4 independent culture). The amount of Fyn in the PSD was decreased (Student t-test two-tailed Ctrl 27.25 +/- 5.003 vs Jaspla 11.71 +/- 1.786

*p=0.0265, N=4 independent cultures). Together, these results suggest that tau translocation to the synapse depends on the F-actin stabilization which promotes their interaction.

A β oligomers disrupt the link between synaptic activation and tau recruitment to the synapse

In the context of AD, recent publications have highlighted that synaptotoxicity driven by A β exposure relies on the presence of tau (Ittner et al., 2010 ; Roberson et al., 2007). In order to study this pathological regulation of tau, we exposed EGFP-tau and LifeAct-RFP expressing cultures to 100 nM of synthetic human A β (1-42) oligomers (Fig 6A). We observed a delocalization of tau in the synapse within 15 min after A β treatment (Fig 6B; ctrl n=40 N=3, A β 100nM 15 min 0.52 \pm 0.04, 30 min 0.71 \pm 0.05 ***p<0.001 n=79, N=5 independent cultures). We confirmed these results with endogenous tau by western blot analysis of PSD-enriched fractions (Fig 6C). A β exposure induced a translocation of tau into the PSD fraction (Student t-test two-tailed Ctrl 20,12 \pm 1,228 vs A β 29,74 \pm 1.748 ***p=0.0002, N=12 independent culture). This results also showed an increase of PSD-95 (Student t-test two-tailed Ctrl 19.10 \pm 2.557 vs A β 33,3 \pm 2,153 ***p=0.0006, N=9 independent culture), GluA1 (Student t-test two-tailed Ctrl 18.84 \pm 1.930 vs A β 26.22 \pm 1.475 **p=0.0078, N=9 independent culture) and fyn (Student t-test two-tailed Ctrl 19.42 \pm 1.337 vs A β 29.67 \pm 2.181 **p=0.0041, N=6 independent culture) (Fig 6D). Then, we evaluated the effect of a synaptic activation following the A β treatment (Fig 7A). Preceded by 15 min A β treatment, synaptic activation disrupted LifeAct-RFP fluorescence suggesting an alteration of F-actin organization and no additional EGFP-tau recruitment at the synapse. We confirmed these results on endogenous proteins by western blot analysis on PSD positive fractions (Fig 7B). After A β treatment, synaptic activation did not trigger any increase in synaptic markers and, more, it decreased synaptic actin (Fig 7C) (Student t-test two-tailed A β 29.64 \pm 1.495, A β + Bic/4-AP 18.56 \pm 2.030 ***p=0.0009 N=7 independent cultures), PSD-95 (student t-test two-tailed A β 33.37 \pm 2.153, A β + Bic/4-AP 19.25 \pm 2.550 ***p=0.0007 N=7 independent cultures) and tau levels (Student t-test two-tailed A β 29.74 \pm 1.748, A β + Bic/4-AP 20.68 \pm 1.751 **p=0.0014 N=12 independent cultures). Finally, we performed phalloidin precipitation assay after a 15 min A β treatment (Fig 8A) on our neuron culture, and we observed that tau/F-actin content was increased (Fig 8B) (1-way ANOVA ctrl 15.45 \pm 1.529 A β 32.90 \pm 3.181 A β + Bic/4-AP 20.18 \pm 2,671 for actin; ctrl 16.34 \pm 2.618 A β 31.77 \pm 1.952 A β + Bic/4-AP 17.70 \pm 4.080 for tau N=5 independent cultures **, *p<0.05 relative

to ctrl, #p<0.05 relative to A β). A subsequent synaptic activation did alter tau interaction with F-actin.

The pool of synaptic tau evoked by A β is more dynamic and has a distinct phosphorylation state from that induced by synaptic activation

To further understand the mechanisms by which A β exposure and the synaptic activation induced translocation of tau to the synapse, we investigated tau dynamics using a fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique. On neurons transfected with EGFP-tau and LifeAct-RFP, we induced tau translocation to spine by synaptic activation. Then, we photobleached the GFP signal of individual spine heads (Fig 9A) and measured tau fluorescence which resulted in a recovery half-life of 4.829 s and a plateau of 50.83 % (Fig 9B). The recovery curves indicated 3 pools of tau, a mobile, unbleached fraction comprising 9.72% +/- 1.03, a dynamic fraction at 47.08% +/- 3.06 and a stable, unrecoverable fraction at 42.75% +/- 2.78. This stable fraction suggests a large portion of tau is anchored in the spine. When we investigated A β driven tau translocation to the synapse, we did not see any change in half-life recovery (4,729 s) from those measured with synaptic activation. However the plateau value was drastically modified (71.20 %), illustrating that, while A β induced tau translocation, the resulting synaptic tau is less stable. Comparison between synaptic activation and A β showed a significant difference between their dynamic fractions (fig 9C, respectively Student-t test two tailed Bic/4AP dynamic fraction 47.09 +/- 3.063 N=21 spines on 4 independent cultures A β 68.49 +/- 2.64 N= 24 on 4 independent cultures, ***p<0.0001).

Tau is a phosphorylated protein containing 80 potential phosphorylation sites (Sergeant et al., 2005). Alterations of tau localization in disease states are associated with abnormal phosphorylation of tau (Hoover et al., 2010; Tai et al., 2012 ; Merino-Serrais et al., 2013), thus, we investigated the phosphorylation state of tau following synaptic activation or A β exposure (fig 9 D). We chose to investigate the phosphorylation states of two representative residues that have both been described as sites of physiological and pathological phosphorylation: one located in the proline rich domain, Thr-205, and one located in the C-terminus domain, Ser-404 (Merino-Serrais et al., 2013; Sergeant et al., 2005). Thr-205 phosphorylated-tau was only increased under synaptic activation in PSD fraction (Fig 9E, Ctrl 24.57 +/- 0.9754 vs Bic/4-AP 38.90 +/- 1.936) while it was decreased after A β treatment (Ctrl 24.57 +/- 0.9754 vs A β 13.64 +/- 2.416). Synaptic activation following A β exposure did not produce any significant Thr-205 phosphorylation of tau (A β +Bic/4-AP 22.89 +/- 2.796 vs Bic/4-AP 38.90 +/- 1.93; vs A β

13.64 \pm 2.50). At the opposite, only A β exposure promoted significant tau phosphorylation on Ser 404 (One-way ANOVA Ctrl 15.67 \pm 2.418 vs A β 32.65 \pm 3.76 vs Bic/4-AP 26.75 \pm 1.17 vs A β +Bic/4-AP 24.97 \pm 4.48 ** p <0.05 N=4). These results revealed that although synaptic activation or A β promote tau translocation to PSD fractions, the synaptic tau displays a different phosphorylation profile that may be responsible for the conditional tau properties observed.

Discussion

Although tau has been extensively studied for its role as an axonal MAP, the discovery of its synaptic localization under pathological conditions has raised extensive questions on the consequence of this mislocation (Ittner and Götz, 2010). Here, we report for the first time that tau displays a widespread distribution in the dendrites and responds to synaptic input by trafficking from the dendritic shaft to the post-synaptic compartments. The trafficking of tau occurs under pharmacological and electrophysiological synaptic plasticity stimulation paradigms in primary culture and acute hippocampal slice, respectively. This activity-dependent tau translocation is concomitant with major re-compositions of the post synaptic protein content that results in an increase in PSD-95, glutamatergic AMPA receptors GluA1, actin and tau's proposed partner, Fyn kinase. Together, our results are consistent with tau having a post-synaptic role in the organization that sustains synaptic plasticity. Further, we demonstrate that once translocated to the synapse, tau interacts with the most predominant cytoskeleton element of the post synaptic structure: F-actin. This interaction is consistent with a possible implication in the complex cascade leading to synaptic potentiation. Further supporting this hypothesis, we observed that pharmacological stabilization of F-actin with jasplakinolide also induces synaptic tau trafficking, which suggests a link between F-actin and tau. Interestingly, we found that by exposing cortical neurons to synthetic A β , tau translocates to spines without induced synaptic activation. This mislocation of tau into the spine heads is a characteristic feature observed in Alzheimer's disease (Tai et al., 2012) and Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) and tau P301L mutation (Hoover et al., 2010). Synaptic activation subsequent to A β did not further increase tau content into the dendritic spines, which suggests that A β exposure disrupts the activity-dependent enrichment of tau concomitant with the preclusion of synaptic plasticity.

The identification of activity-driven translocation of tau to the synaptic compartment is consistent with Ittner et al. (2010), who described tau function as carrying the Src kinase, Fyn, to the synaptic compartment following synaptic activation. The present findings also add to the

growing body of evidence consistent with a wide distribution of neuronal tau in the dendrites (Tashiro et al., 1997) as well as the axon (Mandell and Banker, 1996). Once located in the spines, tau may contribute to spine morphology. Such a role is supported by previous observations that the silencing of tau expression using small hairpin RNA produced spine loss in cultured neurons (Chen et al., 2012).

The stimuli that led to tau translocation into spine heads also induced the long-lasting modifications of the post-synaptic element that characterize LTP. The tau increase in PSD-enriched fraction is concomitant with enrichment in PSD95 and GLUA1, both of which are necessary characteristics of synaptic potentiation (Ehlers, 2003; Steiner et al., 2008 ; Kessels and Malinow, 2009). Following the same behavior of well-known plasticity-related synaptic proteins, such as GluA1, PSD-95 or Actin, suggests that tau may contribute to the functional modifications that sustain the enhanced synaptic strength associated with LTP. The role of tau in synaptic plasticity could be due to its ability to transport the Src kinase Fyn to synaptic targets (eg. GluN2B subunits of the NMDA receptor). In accordance with this hypothesis, tau KO mice or those expressing tau without microtubule binding domains, display no Fyn in the PSD fraction (Ittner et al., 2010). The importance of Fyn in synaptic plasticity processes is underscored by the decreased LTP observed in Fyn KO mice (Grant et al., 1992 ; Kojima et al., 1997).

Tau interacts with F-actin in both purified protein assay and spines. This interaction was identified and characterized for the first time in similar purified protein assay. It involves tau microtubule-binding domains and the portion of the proline-rich domain that directly interacts with F-actin (He et al., 2009). Similarly, this interaction has been identified in PC12 cells (Yu, 2006), and in a drosophila model of AD (Fulga et al., 2006). The consequences of the interaction between tau and F-actin are a stabilization of actin filaments and their organization into bundles. Here, we show that interaction between F-actin and tau is increased during synaptic activation. The role of actin in the structural re-organization necessary for synaptic plasticity has been extensively studied (for review, see Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Indeed, modulation of actin dynamics toward F-actin complex structures can be considered as one of the key elements responsible for the activity-dependent modification of spine morphology during synaptic plasticity (Star et al., 2002). Thus, tau may be important for synaptic plasticity because of its ability to influence F-actin structure or stability.

Finally, when we reproduced pathological conditions observed in AD by exposing cortical neurons to A β , we observed a translocation of tau to the synapse despite the lack of synaptic

activation. This result is consistent with abnormal tau accumulation in dendritic spines (Hoover et al., 2010). Recently, similar synaptic accumulation of tau has been described in AD patients, further strengthening the hypothesis that abnormal synaptic localization of tau may be involved in the synaptic dysfunction observed in AD (Tai et al., 2012). Under A β exposure, tau still interacts with F-actin once in the post-synaptic compartment. Our FRAP data highlighted a more dynamic pool of synaptic tau under A β compared to that evoked by synaptic activation, which suggests that tau interactions with its potential partners in the synapse, such as F-actin, are disturbed. This likely disrupts tau-related modification of the post-synaptic content observed during synaptic plasticity. As a consequence, synaptic activation in the presence of A β did not lead to increased levels PSD95 or GluA1 in the PSD fraction and precluded the establishment of long-lasting modification of synaptic strength, which is consistent with the exhaustive reports of A β impairing LTP (Li et al., 2011 ; Selkoe, 2008 ; Shankar et al., 2007).

The difference in tau behavior depending on the stimulus driving it to the synapse is puzzling and may rely on the variation in the phosphorylation profile (Allyson et al., 2010 ; Mondragon-Rodriguez et al., 2012). It is now well accepted that tau function and localization to the membrane, nucleus, synapse or axons, is modulated by phosphorylation (Pooler et al., 2012);(Hoover et al., 2010; Mandell and Banker, 1996; Sultan et al., 2011). We showed that A β and synaptic activation display differences in the phosphorylation of two tau phospho-epitopes. Under synaptic activation PSD located tau is phosphorylated on threonine 205 while it is largely dephosphorylated under A β exposure. In contrast, Serine 404 is not differentially phosphorylated between these two experimental conditions.

In summary, we bring evidence that under physiological stimulations tau may be involved in the molecular cascade leading to synaptic plasticity. A β renders the synapse unable to establish plasticity-related modifications of the post-synaptic content. The disruption of the activity-driven relocalization of tau to the synapse by A β could be one of the synaptotoxic steps in the progression of AD. The mechanism responsible for the altered localization of tau may represent a novel therapeutic approach for tauopathies, including AD.

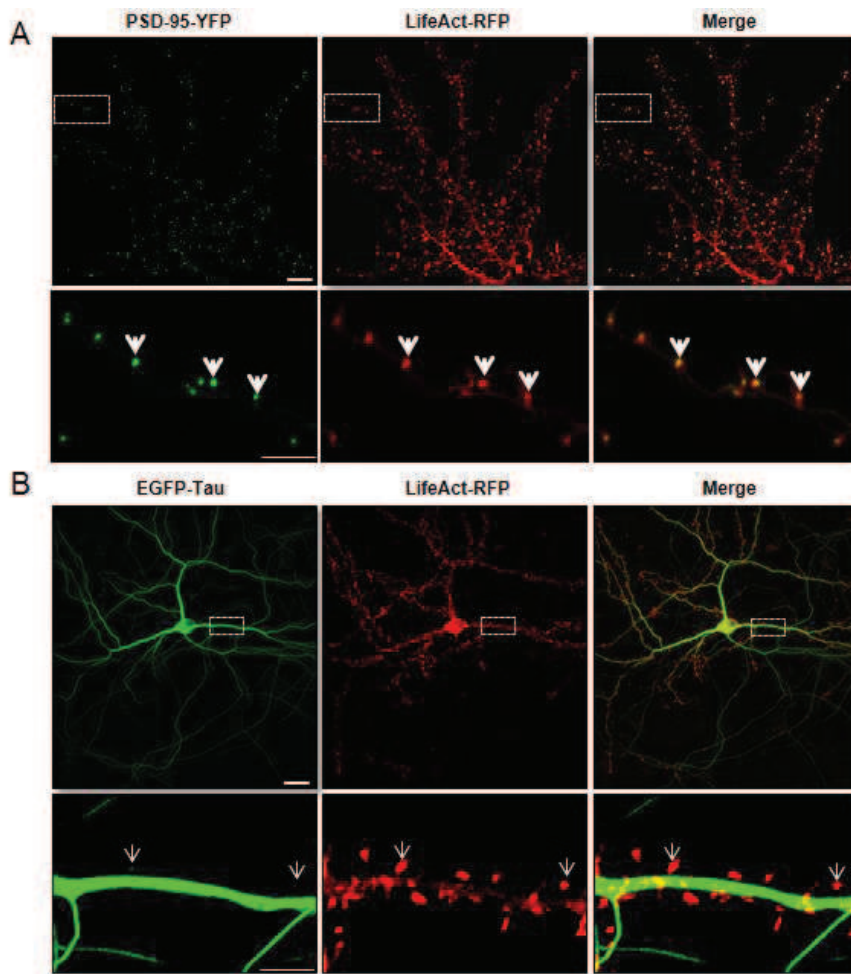


Figure 1: LifeAct co-localizes with PSD-95-YFP in dendritic spines and displays a limited colocalization with EGFP-Tau.

A) Confocal imaging of dendritic spines of primary murine cortical neuronal cultures (14 DIV) co-transfected with life-actin-RFP and PSD-95-YFP 48h before imaging. Merge images show the co-localization (in yellow, white arrows) of PSD-95 and filamentous actin in dendritic spines. B) Dendritic spines of cortical neuron culture co-transfected with LifeAct-RFP and EGFP-Tau. Merge images show only limited co-localization of EGFP-Tau in the indicated dendritic spines (white arrows). Scales bars in the upper panel: 10 μm , lower panel: 5 μm .

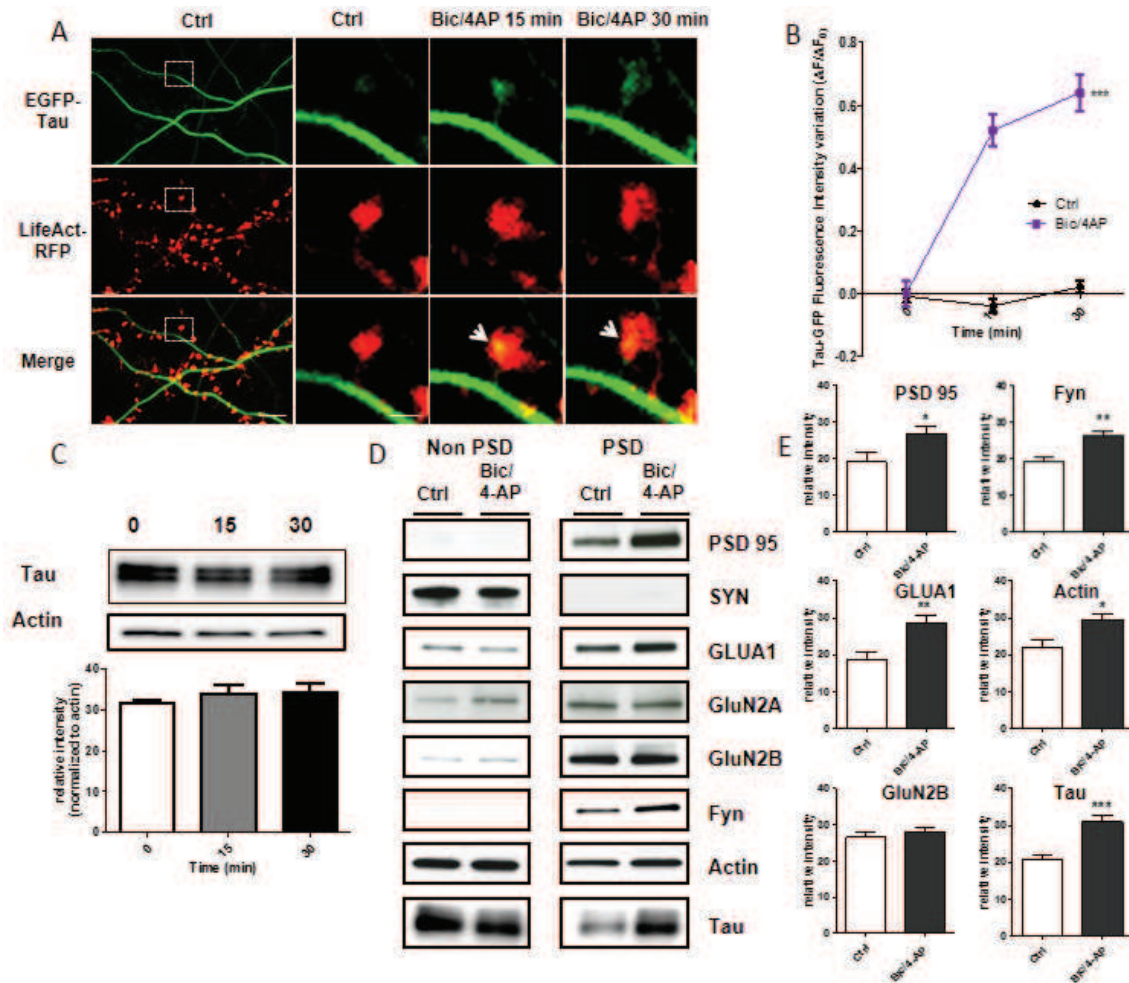


Figure 2: Synaptic activation induced by Bicuculline/4-Amino-pyridine triggers translocation of tau into dendritic spines of primary cortical neuron cultures. A) Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) co-transfected with EGFP-Tau and LifeAct-RFP. Left panel shows the spatial repartition of EGF-Tau (in green) and LifeAct-RFP (in red) in non-activated neuron. The merge image displays only minor co-localization (yellow) scale bar: 5 μ m. Right panel: Higher magnification of EGFP-Tau, LifeAct in dendritic spines (designated box in the left panel) of neuron following synaptic activation triggered by 15 and 30 min of Bic/4AP exposure. The merge image shows the activity driven co-localization of tau/LifeAct (in yellow) in the activated dendritic spine after 15 and 30 minutes Bic/4-AP exposure. Scale bar: 1 μ m. B) Quantification of fluorescence intensity mediated by EGFP-Tau in the head of spines during synaptic activation (Bic/4-AP treatment). The graph represents the evolution of $\Delta F/F_0$ generated by EGFP-Tau in neurons subjected to synaptic activation or not. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test (Mean \pm SEM *** p <0.0001, ctrl n=40 spines on 3 independent cultures; Bic/4-AP n=162 spines on 5 independent cultures). C) Representative western blot of endogenous tau expression in a whole lysate extract of cortical neurons (14 DIV) exposed to Bic/4-AP for 15 and 30 min. Quantification of tau expression normalized to actin levels does not display any change. D) Representative Western blots of protein expression from primary cortical cultures following fractionation. Pre-synaptic protein (synaptophysin), post-synaptic proteins (PSD-95, GluA1, GluN2A, GluN2B, Fyn), cytoskeletal protein (actin) and tau in non-PSD fraction (triton-soluble fraction) and PSD-fraction (triton-insoluble fraction) on primary cortical neurons treated 15 min with Bic/4-AP. E) Quantitative analysis of PSD-95, GluA1, GluN2B, GluA1, fyn, actin and tau in PSD fraction under control and Bic/4-AP (15min) treated conditions is shown in graphs (Mean \pm SEM Student t-test two-tailed,*** p <0.001 ** p =0.0026; * p =0.0101 $N \geq 7$ independent cultures).

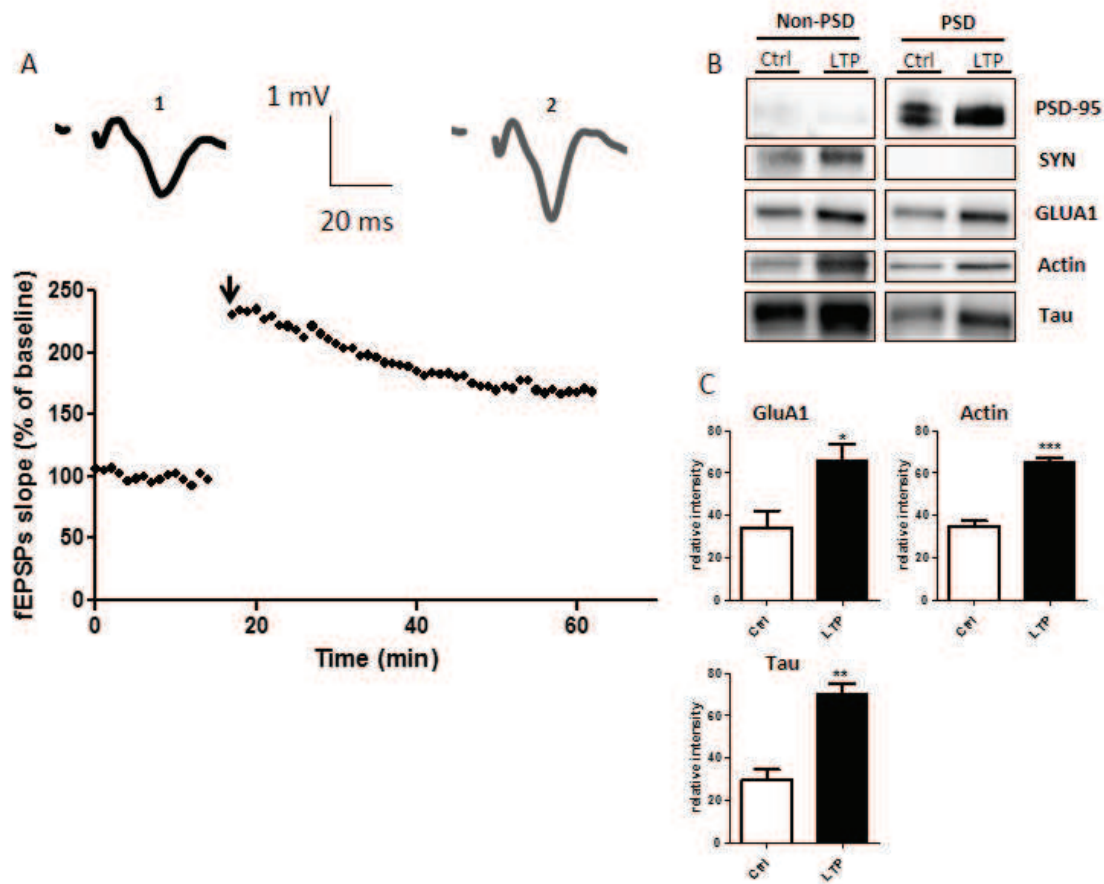


Figure 3: LTP in hippocampal slices triggers translocation of tau to CA1 dendritic spines

A) Representative curve of fEPSPs slope in % of baseline illustrating the LTP induction in CA1 region of hippocampus slices. Sample EPSPs are shown before (1) and after (2) LTP induction. B) Representative western blots of synaptic protein expression from the CA1 region of hippocampal slices subjected to LTP protocol. C) Quantifications of western blot from GluA1, actin and tau in ctrl and LTP conditions (Mean \pm SEM Student t-test two-tailed, * $p=0.0346$, ** $p=0.0011$, *** $p=0.0002$, N=4 independent slices).

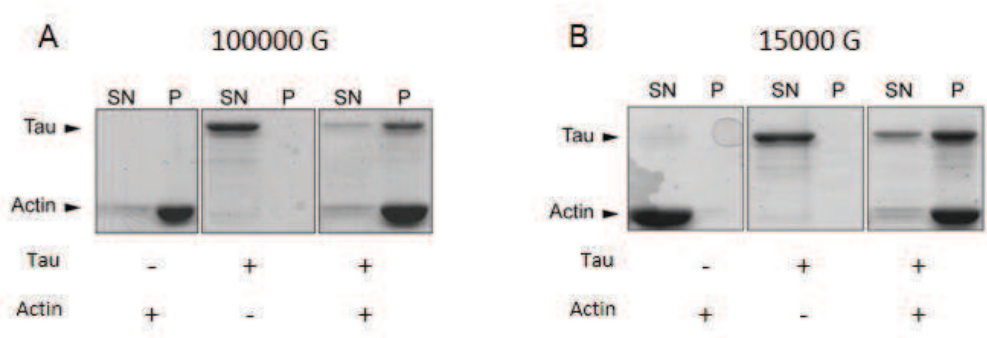


Figure 4: Tau interacts with actin in purified system

Co-sedimentation of actin filaments with tau. Actin was polymerized at 5 μ M for 1h at room temperature in the absence or in the presence of 1 μ M Tau. The reaction mixtures were then centrifuged at 100,000 x g to sediment actin filaments (A) or at 15,000 x g to precipitate only actin bundles (B). Supernatants (SN) and pellets (P) were applied to 10% SDS-PAGE gel and proteins were stained with Coomassie-Blue.

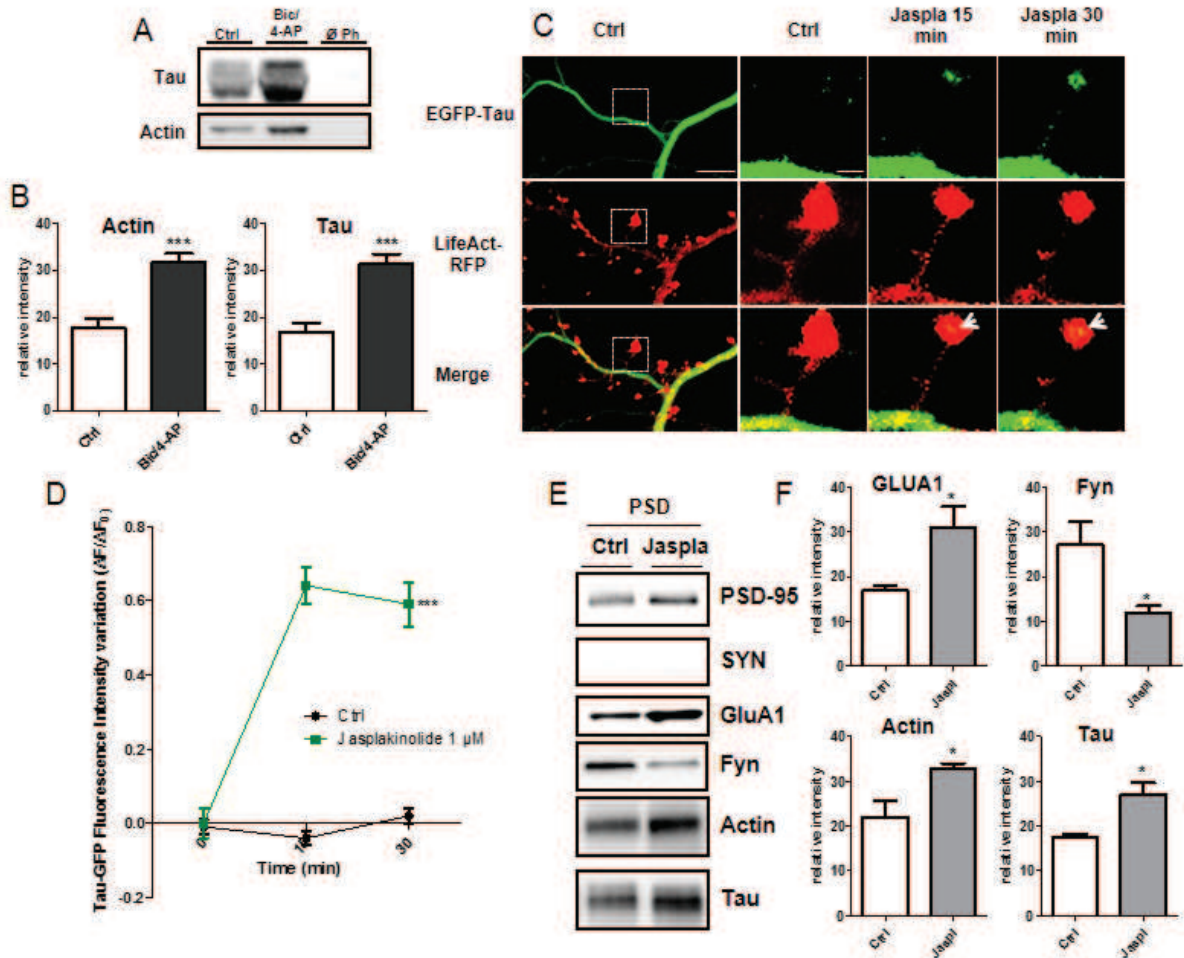


Figure 5: Tau interacts with filamentous actin in the synaptic compartment.

A) Representative western blot showing filamentous actin-associated tau in cultured cortical neurons treated for 15 min with Bic/4-AP. Cell lysate was collected after treatment and filamentous actin precipitated with phalloidin as described in methods. B) Quantifications of actin and tau in ctrl and Bic/4-AP condition (Mean \pm SEM Student t-test two-tailed, *** $p < 0.001$, $N = 7$ independent cultures). C) Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) co-transfected with EGFP-Tau and LifeAct-RFP treated with jasplakinolide ($1 \mu\text{M}$), a specific agent which stabilizes F-actin. Left panel: Crop view of dendritic branch of transfected neuron under control condition Scale bar: $5 \mu\text{m}$. Right panels: higher magnification of EGFP-Tau and LifeAct-RFP in dendritic spines (cropped view of dotted box in the left panel) of neuron before, 15 and 30 minutes after jasplakinolide ($1 \mu\text{M}$) treatment. The merge image shows colocalization of EGFP-Tau and LifeAct-RFP (white arrows). Scale bar: $1 \mu\text{m}$. D) Quantification of the fluorescence intensity variation ($\Delta F/F_0$) of EGFP-Tau in the head of spines during actin network stabilization (jasplakinolide treatment). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test (Mean \pm SEM *** $p < 0.0001$, ctrl $n = 40$ $N = 3$ independent cultures, Jasplakinolide $n = 106$, $N = 4$ independent cultures). E) Representative western blots of protein expression from PSD-enriched fraction primary cortical cultures treated or not with jasplakinolide ($1 \mu\text{M}$, SYN: synaptophysin, PSD-95, GluA1, Fyn actin and tau in PSD-fraction (triton insoluble fraction)). F) Quantitative analysis of western blots of PSD-95, GluA1, actin and tau in PSD fraction (Mean \pm SEM Student t-test two-tailed, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ $N = 4$ independent cultures).

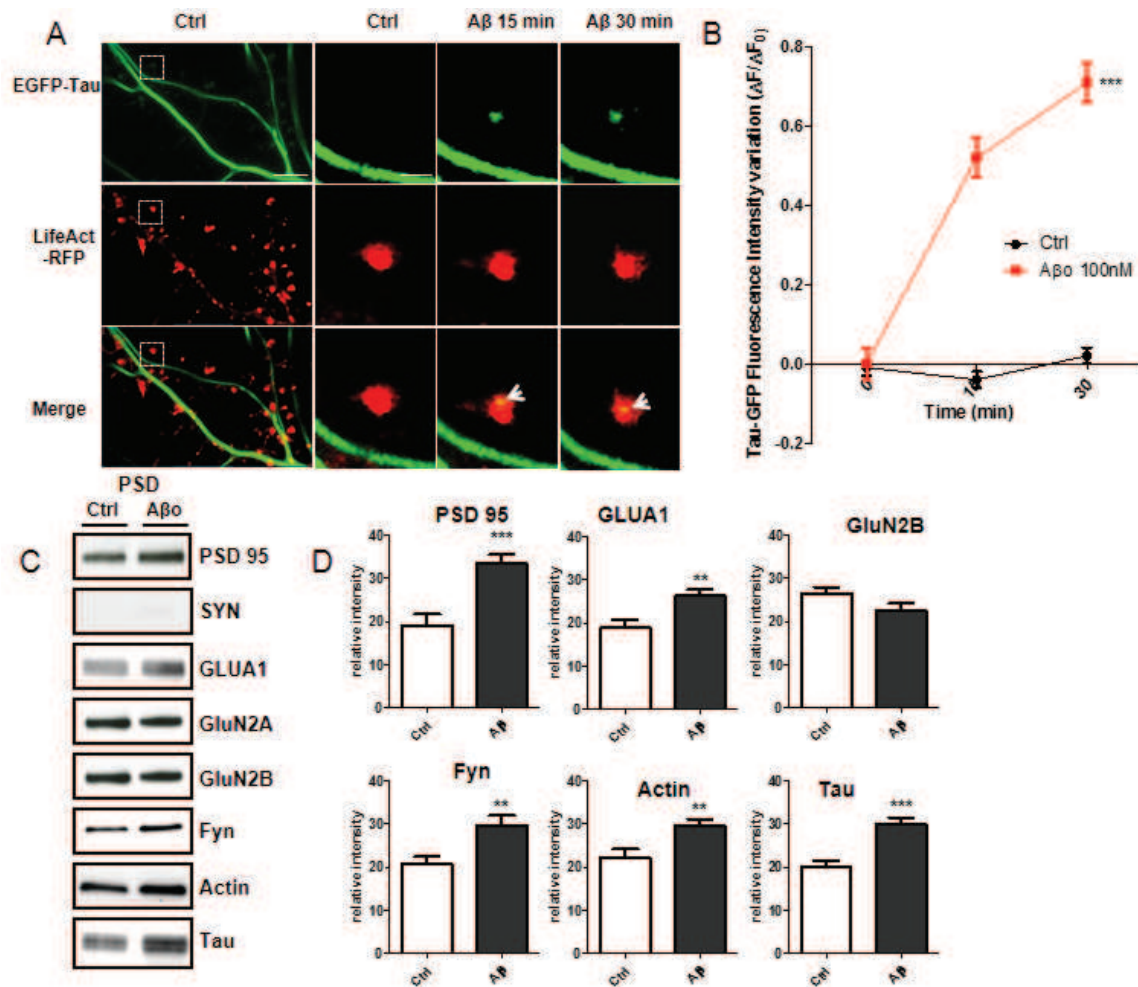


Figure 6: A β treatment in primary cortical neuron cultures induces synaptic mis-localization of EGFP-Tau A) Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) co-transfected with EGFP-Tau (full length human tau) and life-actin RFP. Left panel shows the spatial repartition of EGFP-Tau (in green) and LifeAct-RFP (in red) in non-treated neuron scale bar: 5 μ m. Right panel: higher magnification of EGFP-Tau and LifeAct-RFP in dendritic spine neuron following A β treatment (15 and 30 min, designated box in the left panel) by 15 and 30 minutes of A β 100nM treatment. The merge image shows co-localization of F-actin and tau (yellow, area indicated with white arrows) Scale bar: 1 μ m. B) Quantification of the fluorescence intensity of EGFP-Tau in the head of spines during the A β treatment. The graph represents the evolution of $\Delta F/F_0$ generated by EGFP-Tau induced by A β 100nM treatment. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test (Mean \pm SEM ***p<0.001, ctrl n=40 N=3 independent cultures; A β 100nM n=79, N=5 independent cultures). C) Representative western blots of protein expression from fractionated primary cortical cultures treated or not with A β (100 nM) during 30 min. Pre-synaptic protein (synaptophysin), post-synaptic proteins (PSD-95, GluA1, GluN2A, GluN2B, Fyn), cytoskeletal protein (actin) and tau in PSD-fraction (triton insoluble fraction) were analyzed. D) Quantitative analysis of PSD-95, GluA1, GluN2B, GluA1, Fyn, actin and tau in PSD fractions (Mean \pm SEM Student t-test two-tailed, ***p<0.001 **p<0.01; n \geq 7 independent cultures).

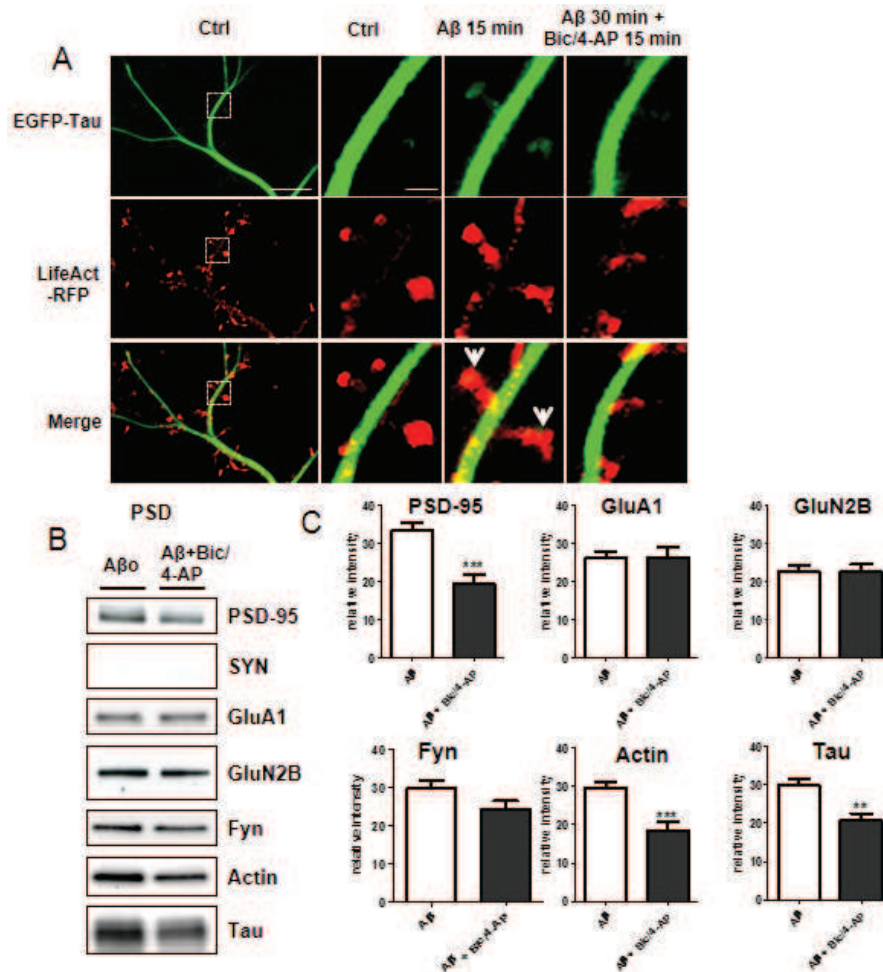


Figure 7: A β treatment on primary cortical neuron cultures induces synaptic mis-localization of endogenous tau which is disrupted by synaptic activation. A) Confocal imaging of cortical neurons (14 DIV) co-transfected with EGFP-Tau and LifeAct-RFP. Left panel shows the spatial repartition of EGFP-Tau (in green) and LifeAct-RFP (in red) in untreated neurons scale bar: 5 μ m. Right panel: higher magnification of EGFP-Tau and LifeAct-RFP in a dendritic spine (designated box in the left panel) neuron showing the effect of 15 min of A β on tau localization (green) and actin cytoskeleton (red) followed by 15 min 15 min of Bic/4-AP. Scale bar: 1 μ m. B) Representative western blots of protein expression from fractionated primary cortical neurons treated with A β (100nM) then 15 min with Bic/4-AP. Pre-synaptic protein (synaptophysin), post-synaptic proteins (PSD-95, GluA1, GluN2A, GluN2B, Fyn), cytoskeleton protein (actin) and tau in PSD-fraction (triton insoluble fraction) were analyzed. C) Quantitative analysis of PSD-95, GluA1, GluN2B, GluA1, Fyn, actin and tau in PSD fraction (Mean \pm SEM Student t-test two-tailed, n \geq 7).

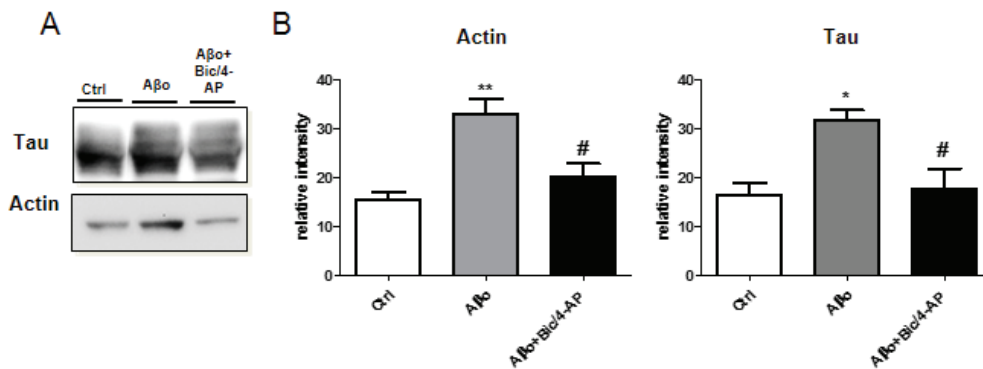


Figure 8: Aβ treatment on primary cortical neuron cultures increases the interaction of F-actin with tau which is reduced after synaptic activation. A) Representative western blot showing the effect of 30 min Aβ (100nM) and the effect of 15 min pre-treatment with Aβ (100nM) then 15 min of Bic/4-AP treatment on tau associated with F-actin in cultured cortical neurons. F-actin was collected after treatment and precipitated with phalloidin. B) Western blot analysis of actin and tau in ctrl, Aβ (100nM) and Aβ (100nM) + Bic/4-AP 15 min condition (1-way ANOVA **, *p<0.05 relative to ctrl, #p<0.05 relative to Aβ, N=5 independent cultures).

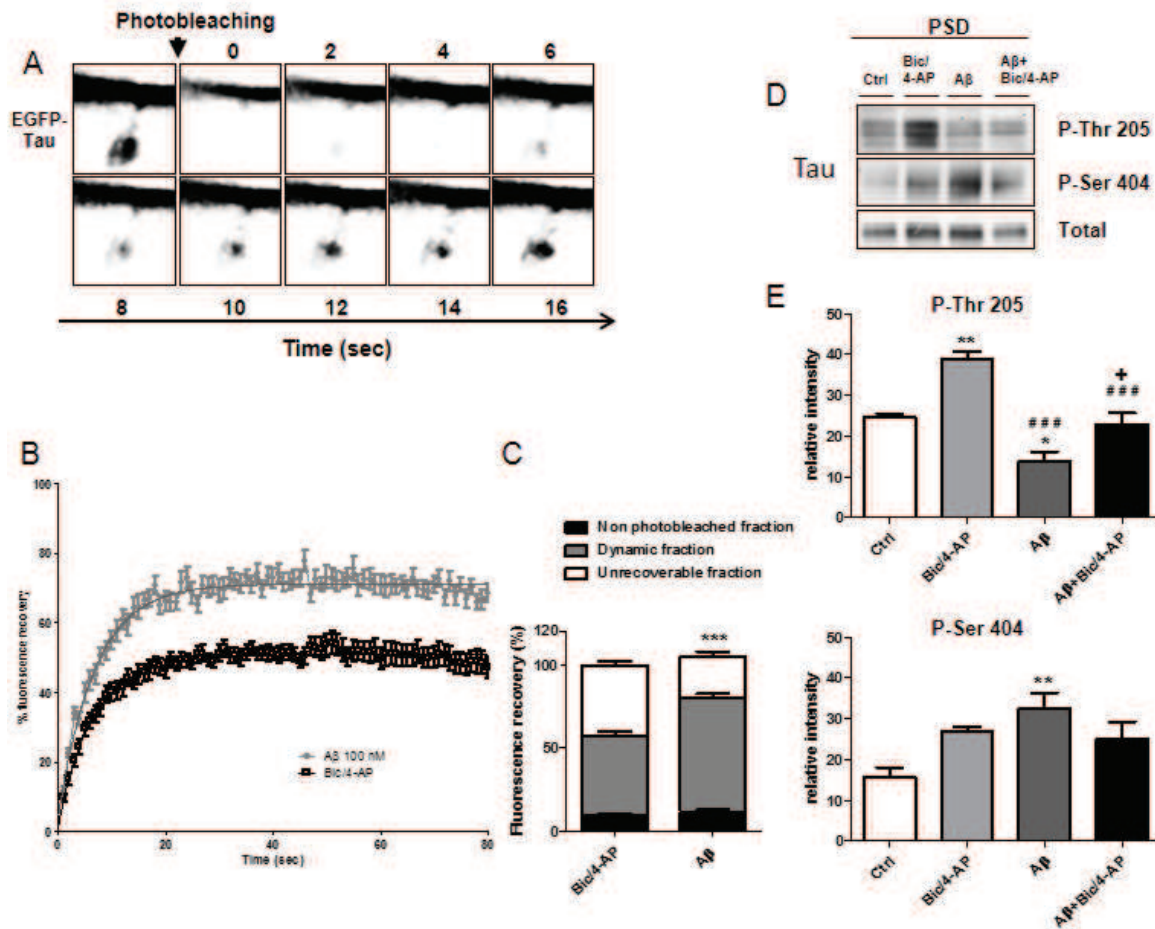


Figure 9: The dynamics of tau in spines changes is distinct between translocation inducing synaptic activation from A β exposure and could be phosphorylation-dependent A) Time-lapse of a spine pre-treated with Bic/4-AP containing EGFP-tau and showing fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). B) Representative FRAP curves (%FRAP normalized to the pre-bleached intensity of the spine of EGFP-Tau transfected neurons), after 45 min of Bic/4AP (n= 21) or 45 min after A β o application (n=24). C) % of EGFP-tau fluorescence that was stable (white), dynamic (gray) or unbleached (black). Statistical analysis was performed by two-tailed t-test ***p<0.0001. D) Representative western blot of Tau phospho-Threonine 205 (p-Thr205), phospho-Serine 404 (p-Ser 404) and tau total from PSD-enriched fractions for ctrl, Bic/4-AP (30 min), A β (30 min) and A β (15min)+Bic/4-AP (15 min) conditions. E) Quantifications of p-Thr 205 and p-Ser 404 under ctrl, Bic/4-AP, A β , A β +Bic/4-AP conditions (Mean +/- SEM, (**,* relative to ctrl;###relative to Bic/4-AP,+ relative to A β , one-way ANOVA with Bonferroni post-test, p>0.05 N= 5 independent cultures).

Acknowledgments:

This work was supported by the Fondation Neurodis, by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) joined ATIP-Avenir program, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR MALAAD program MALZ). A.E. is supported by a grant from the Région Rhône-Alpes (program « CIBLE 2011 »). We thank Dr. N. Sergeant (Lille, France) for providing us with His-tagged human Tau plasmid.

References:

- Allyson, J., Dontigny, E., Auberson, Y., and Cyr, M. (2010). Blockade of NR2A-containing NMDA receptors induces Tau Phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural Plasticity* 2010:340168
- Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Zhong, M., Xu, S., Chen, C., Li, L., and Yu, Z. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International* 60, 233-242.
- Coué, M., Brenner, S., Spector, I., and Korn, E. (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters*. 213(2) 316-318.
- Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience* 6, 231-42.
- Fulga, T., Elson-Schwab, I., Khurana, V., and Steinhilb, M. (2006). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nature Cell. Biol.* 9: 139-148
- Götz, J., Xia, Leinenga, G., Chew, Y.L., and Nicholas, H. (2013). What Renders TAU Toxic. *Frontiers In Neurology* 4.(72):1-10
- Grant, S., O'dell, T., Karl, K., Stein, P., and Soriano, P. (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*.258:1903-1910
- He, H., Wang, X., Pan, R., Wang, D., Liu, M., and He, R. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biology*. 10:81-92
- Hoover, B.R., Mir, Reed, A.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., et al. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067-1081.
- Hotulainen, P., and Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal Of Cell Biology* 189, 619-629.
- Ittner, L.M., and Götz, J. (2010). Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 12, 65-72.
- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell* 142, 387-397.
- Jaworski, T., Kügler, S., and Leuven, F. (2010). Modeling of tau-mediated synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Journal Of Alzheimer's Disease*. 2010 pii:573138
- Kessels, H.W., and Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* 61, 340-350.

- Kojima, N., Wang, J., and Mansuy, I. (1997). Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA.* 94:4761-4765
- Lazaro-Diequez, F., Aguado, C., Mato, E., Sanchez-Ruiz, Y., Esteban, I., Alberch, J., Knecht, E., and Egea, G. (2008). Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. *Journal Of Cell Science* 121, 1415-1425.
- Lee, G., Newman, S., Gard, D., and Band, H. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *Journal of Cell.Sci.* 111:3167-3177
- Leveille, F., gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., and Buisson, A. (2008). Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *The FASEB Journal* 22, 4258-4271.
- Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N.E., Shankar, G.M., and Selkoe, D.J. (2011). Soluble A β Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors. *Journal Of Neuroscience* 31, 6627-6638.
- Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 87, 8422-6.
- Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annual Review Of Neuroscience* 25, 103-126.
- Mandell, J., and Banker, G. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *The Journal Of Neuroscience.* 16 (18):5727-5740.
- Merino-Serrais, P., Benavides-Piccione, R., Blazquez-Llorca, L., Kastanauskaite, A., Rabano, A., Avila, J., and DeFelipe, J. (2013). The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 136, 1913-1928.
- Mondragon-Rodriguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., and Boehm, J. (2012). Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Tau Phosphorylation. *Journal Of Biological Chemistry* 287, 32040-32053.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., and Mucke, L. (2011). The Many Faces of Tau. *Neuron* 70, 410-426.
- Pooler, A.M., Usardi, A., Evans, C.J., Philpott, K.L., Noble, W., and Hanger, D.P. (2012). Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiology Of Aging* 33, 431.e27-431.e38.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods* 5, 605-607.
- Roberson, E.D., Scarce-Lavie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-., and Mucke, L. (2007). Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science* 316, 750-754.
- Selkoe, D.J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research* 192, 106-113.
- Sergeant, N., Delacourte, A., and Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease* 1739, 179-197.

- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *Journal Of Neuroscience* 27, 2866-2875.
- Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., and Murthy, N.V. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature Neuroscience* 5, 239-246.
- Steiner, P., Higley, M.J., Xu, W., Czervionke, B.L., Malenka, R.C., and Sabatini, B.L. (2008). Destabilization of the Postsynaptic Density by PSD-95 Serine 73 Phosphorylation Inhibits Spine Growth and Synaptic Plasticity. *Neuron* 60, 788-802.
- Stine, W.B. (2003). In Vitro Characterization of Conditions for Amyloid-beta Peptide Oligomerization and Fibrillogenesis. *Journal Of Biological Chemistry* 278, 11612-11622.
- Sultan, A., Nesslany, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *Journal Of Biological Chemistry* 286, 4566-4575.
- Tai, H.C., Tai, H., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M.P., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2012). The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is Associated With Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System. *The American Journal Of Pathology* 181, 1426-1435.
- Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., and Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport*.8:2797-2801.
- Trojanowski, J.Q., Schuck, T., Schmidt, M.L., and Lee, M.V. (1989). Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry* 37, 209-215.
- Yu, J.-. (2006). Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *The FASEB Journal* 20, 1452-1461.

3. Conclusion et illustration du modèle

Bien que tau ait été particulièrement étudiée pour son rôle de MAP axonale, la découverte de sa localisation synaptique dans des conditions pathologiques a fait émerger plusieurs questions sur les conséquences de sa localisation (Ittner et Götz, 2010). Dans le travail que nous avons mené, nous rapportons pour la première fois que tau possède une distribution dendritique et répond à une activation synaptique par son déplacement du compartiment dendritique vers le compartiment post-synaptique. Ce trafic de tau a été illustré par des paradigmes de stimulation synaptique pharmacologique et électrophysiologique dans des cultures primaires de neurones corticaux et dans des tranches d'hippocampes respectivement. Cette augmentation de tau dans le compartiment synaptique est concomitante avec l'augmentation de GluA1, PSD-95, l'actine, et fyn, protéines nécessaires à l'instauration de la LTP. Par analogie, l'augmentation de tau à la synapse suggère une nécessité de cette protéine dans la PSD.

Illustrée comme partenaire et transporteur de fyn à la synapse, tau possède un autre partenaire démontré ici, le cytosquelette d'actine. Cette interaction entre tau et l'actine-F avait été mise en évidence dans un système purifié (He *et al.*, 2009), modèle cellulaire (Yu, 2006) et chez la drosophile dans un modèle pathologique de la MA (Fulga *et al.*, 2006). L'étude en système purifié de l'action de tau sur des filaments d'actine montre ici que celle-ci peut interagir avec les filaments d'actine et regrouper ces filaments entre eux pour former des « bundles », des regroupements de filaments. La fonction de tau pourrait s'illustrer au niveau synaptique par un possible rôle d'organisation et stabilisation des filaments d'actine et le trafic de tau à la synapse pourrait être actine dépendant. C'est ce que montre l'utilisation de la jasplakinolide, agent pharmacologique bloquant la dépolymérisation sur l'extrémité « - » du filament, qui induit une accumulation de tau synaptique. De plus, la précipitation à la phalloïdine de l'actine filamenteuse révèle lors d'une activation synaptique, une augmentation de la formation de filament d'actine accompagné par une augmentation de tau. Ces résultats montrent qu'un lien existe entre la dynamique de l'actine et tau. Ainsi, cette interaction entre l'actine filamenteuse et tau pourrait expliquer le passage de tau du compartiment dendritique au compartiment synaptique.

Dans le contexte de la MA, l'exposition à des oligomères d'A β conduit à une délocalisation de tau à la synapse, indépendamment d'une activation synaptique. Les A β o rompent donc le lien entre activation synaptique et déplacement de tau. Cette délocalisation de tau s'accompagne d'une augmentation de fyn, mais aussi de PSD-95 et GluA1 ainsi que de l'actine. Pour différencier le comportement de tau entre activation synaptique et exposition aux A β o, une

approche dynamique qui est celle du recouvrement de la fluorescence après photo-blanchiment (FRAP : fluorescence after photo-bleaching) a permis de mettre en évidence que la dynamique de tau diffère entre ces deux conditions. En effet, la protéine tau dans la synapse est plus stable sous activation synaptique et plus dynamique sous $A\beta$. Ces résultats montrent une véritable différence dans le comportement de tau, qui, dans le cas d'une activation synaptique, est stabilisé à la synapse, et pourrait par exemple participer à la fois à la stabilisation du cytosquelette d'actine et formé un complexe entre Fyn, GluN2B et PSD-95 (Ittner *et al.*, 2010 ; Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). Etant moins stable sous $A\beta$, tau pourrait s'accumuler de façon anarchique à la synapse et augmenter par exemple de façon conséquente la quantité de fyn à la synapse.

L'étude des différences entre $A\beta$ et activation synaptique révèle aussi une différence de l'état de phosphorylation de tau sur deux épitopes : la Thr-205 et la Ser-404, tous deux épitopes physiologiques de phosphorylation et retrouvés phosphorylés au niveau synaptique dans les cerveaux de patients atteints de MA (Merino-Serrais *et al.*, 2013). La phosphorylation de la Thr-205 est augmentée sous activation synaptique tandis qu'elle est diminuée sous l'effet des $A\beta$. La Ser-404 est légèrement augmentée sous activation, mais plus importante sous $A\beta$. Ces résultats montrent les différences de régulation de tau qui surviennent durant ces deux phénomènes expliquant peut-être la différence entre la « tau pathologique » et la « tau physiologique ». De façon intéressante, la combinaison d'une activation subséquente au traitement $A\beta$ induit une perte de la réponse synaptique se traduisant par un non-enrichissement voire une diminution des protéines de la PSD, qui s'illustre en microscopie par une altération du cytosquelette d'actine et une incapacité de tau à être recrutée à la synapse. Ces résultats montrent que la présence des $A\beta$ empêche l'installation des processus nécessaires à l'instauration de la LTP expliquant l'altération de celle-ci lors d'une exposition aux $A\beta$ (Li *et al.*, 2011 ; Selkoe, 2008 ; Shankar *et al.*, 2007).

Ainsi, ces résultats apportent des nouvelles informations quant au mécanisme régulant la protéine tau au niveau synaptique et mettent en lumière dans un modèle in vitro de cultures neuronales l'interaction de tau avec l'actine dans le compartiment synaptique. De plus, ils apportent quelques réponses quant aux mécanismes de dérégulation de tau au niveau synaptique dans le contexte de la MA et proposent un modèle de sensibilisation de la synapse par les $A\beta$ qui conduit à une incapacité à répondre à une activation synaptique (Figure 16).

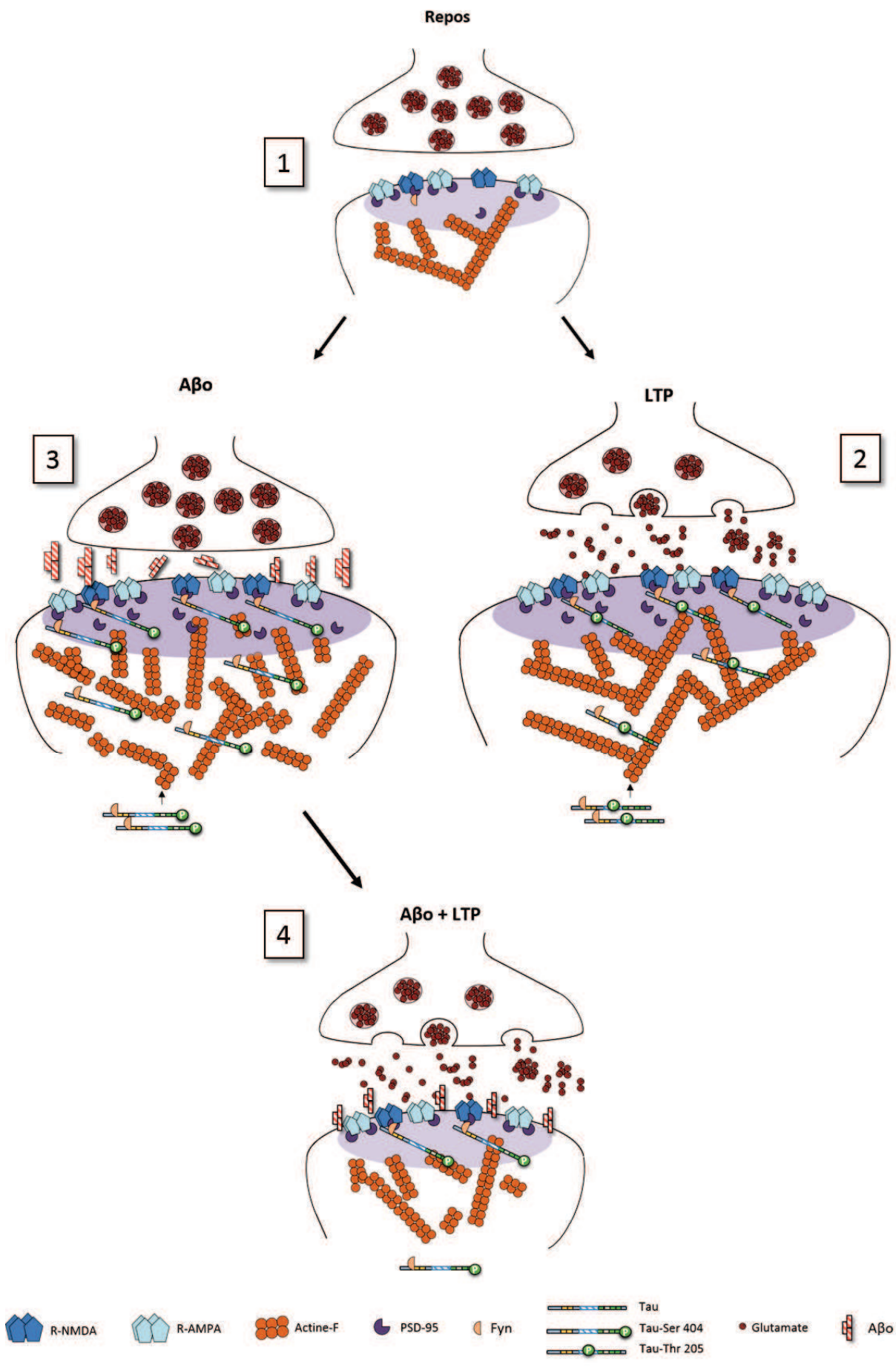


Figure 16 : *Modèle proposé de la dynamique des mécanismes synaptiques illustrant la fonction de tau à la synapse et de l'altération causée par les A β . A l'état de repos, la synapse présente peu ou pas de tau (1). Lors d'une activation synaptique intense comme la LTP, le cytosquelette d'actine se réorganise, s'étend et permet le transport tau à la PSD où celle-ci apporte fyn et forme un complexe tau-fyn-PSD-95-GluN2B. De plus, ce modèle propose un rôle stabilisateur de tau sur l'actine renforçant l'établissement de la LTP (2). Lors d'une application d'A β , les protéines de la PSD sont affectées. Tau monte à la synapse via le cytosquelette d'actine accompagné de fyn et va interagir avec les R-NMDA-PSD-95 et induire une cascade excitotoxique via ces récepteurs. Par les modifications de phosphorylations, tau est moins stable à la PSD et s'accumule à la synapse sans effet stabilisateur sur le cytosquelette (3). Lors d'une activation synaptique subséquente à cette exposition aux A β , la synapse ne peut plus répondre au stimulus, induisant le rétrécissement de l'épine, l'altération du cytosquelette et le retrait de protéines synaptiques (4).*

Partie 2: Perturbation de la plasticité synaptique et du cytosquelette d'actine par les oligomères d'A β

1. Objectif

Le cytosquelette d'actine joue un rôle structural et fonctionnel fondamentaux au sein des épines dendritiques. Il constitue un élément majeur dans les phénomènes de plasticité synaptique. Sa structure et sa dynamique participent à cette plasticité (Cingolani et Goda, 2008) et à l'établissement par exemple de la potentialisation à long terme. La réorganisation du cytosquelette d'actine à la synapse participe à la régulation de plusieurs protéines à la densité post synaptique comme les récepteurs AMPA (Kerr et Blanpied, 2012). Cette potentialisation à long terme est perturbée sous les effets du peptide β -amyloïde (Shankar *et al.*, 2007 ; Selkoe 2008 ; Li *et al.*, 2011), peptide anormalement produit dans la maladie d'Alzheimer.

Le peptide β -amyloïde est principalement décrit comme extracellulaire, mais plusieurs études exposent que l'A β est à la fois produit et internalisé dans la cellule. L'A β intracellulaire a deux origines. D'une part il est produit dans la cellule par le clivage de l'APP situé sur les membranes des organites intracellulaires comme la mitochondrie ou du RE. D'autre part, il est endocyté au niveau du compartiment extracellulaire où il est produit, représentant la majorité de l'A β intracellulaire. Il est internalisé par interaction avec des récepteurs comme par exemple les récepteurs cholinergiques nicotiques, les récepteurs NMDA ou encore les récepteurs aux lipoprotéines (LaFerla *et al.*, 2007). Il peut aussi être internalisé dans des endosomes (Hu *et al.*, 2009). Au niveau intracellulaire, les oligomères d'A β induisent des perturbations comme l'inhibition du protéasome (Almeida, 2006 ; Oh *et al.*, 2005). Ils altèrent aussi le fonctionnement des mitochondries en diminuant leurs activités via perturbation de la chaîne respiratoire (Caspersen *et al.*, 2005). De plus, l'A β intracellulaire altère considérablement les phénomènes de plasticité synaptique comme la LTP (Oddo *et al.*, 2003). L'un des éléments clef de la plasticité synaptique est le cytosquelette d'actine. Il a été montré que l'A β altère sa signalisation en agissant par exemple sur la signalisation des R-NMDA ou encore en induisant la diminution de l'expression de protéines stabilisatrices du cytosquelette comme la drebrin (Penzes et VanLeeuwen, 2011). L'accumulation intraneuronale et synaptique des oligomères d'A β est retrouvée dans les cerveaux de patients, plus particulièrement dans les régions précocement touchées par MA comme le cortex enthorinal et l'hippocampe, ainsi que dans les modèles transgéniques. Le rôle intracellulaire de l'A β est encore peu connu. Les oligomères

ont été relié à l'altération des endosomes proches des synapses par déficit du protéasome ubiquitin dépendant (UPS : ubiquitine proteasome system, Oh *et al.*, 2010). La présence intracellulaire de l'A β soulève la question de l'interaction avec les divers composants synaptiques dont cytosquelette d'actine. Ce travail s'est donc focalisé sur l'impact de l'A β sur le cytosquelette d'actine au niveau synaptique, et sur la possibilité que cet impact soit causé par une interaction directe entre ces deux éléments.

Au cours de cette étude, nous avons utilisé des approches en système protéique purifié, dans des modèles cellulaires et dans des modèles *in vivo* transgéniques afin de mettre en évidence cette possible interaction.

2. Résultats

Les résultats de ces travaux sont présentés dans le document faisant actuellement l'objet d'un article soumis.

Amyloid- β oligomers disrupt synaptic plasticity and actin cytoskeleton dynamics in dendritic spines.

Frédéric Lévillé ^a, Javier Becerril-Ortega ^a, Marie-lise Frandemiche ^g, Antoine Leboucher ^a, Travis Rush ^g, Jose J. Rodríguez ^{b-c}, Roger S. Meadows ^b, Patrick Dutar ^f, Olivier Moustié ^a, Alexei Verkhratsky ^{b,c}, Olivier Nicole ^a and Alain Buisson ^{a,g}

a Université de Caen Basse-Normandie, UMR CNRS CEA 6232, CINAPS, Université Descartes, Centre Cyceron, Bd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France;

b The University of Manchester, Faculty of Life Sciences, 1.124 Stopford Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK; **c** Institute of Experimental Medicine, ASCR,

Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic; **d** IKERBASQUE, Basque

Foundation for Science, 48011, Bilbao, Spain; **e** Department of Neurosciences,

University of the Basque Country UPV/EHU, 48940, Leioa, Spain; **f** Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 2 ter rue d'Alésia, 75014, Paris, France; **g** Grenoble - Institut des Neurosciences

Centre de recherche Inserm U 836-UJF-CEA-CHU, Université Joseph Fourier, 38706 La Tronche Cedex

Amyloid- β oligomers disrupt synaptic plasticity and actin cytoskeleton dynamics in dendritic spines.

Frédéric Lévillé ^a, Javier Becerril-Ortega ^a, Marie-lise Frandemiche ^g, Antoine Leboucher ^a, Travis Rush ^g, Jose J. Rodríguez ^{b,c}, Roger S. Meadows ^b, Patrick Dutar ^f, Olivier Moustié ^a, Alexei Verkhratsky ^{b,c}, Olivier Nicole ^a and Alain Buisson ^{a,g}

a Université de Caen Basse-Normandie, UMR CNRS CEA 6232, CINAPS, Université Descartes, Centre Cyceron, Bd Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex, France;

b The University of Manchester, Faculty of Life Sciences, 1.124 Stopford Building, Oxford Road, Manchester M13 9PT, UK; **c** Institute of Experimental Medicine, ASCR, Videnska 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic; **d** IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011, Bilbao, Spain; **e** Department of Neurosciences, University of the Basque Country UPV/EHU, 48940, Leioa, Spain; **f** Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 2 ter rue d'Alésia, 75014, Paris, France; **g** Grenoble - Institut des Neurosciences Centre de recherche Inserm U 836-UJF-CEA-CHU, Université Joseph Fourier, 38706 La Tronche Cedex

Corresponding Author:

Alain Buisson

Grenoble - Institut des Neurosciences

Centre de recherche Inserm U 836-UJF-CEA-CHU

Université Joseph Fourier

38706 La Tronche Cedex

Telephone: +33 04 56 52 05 21

Fax: +33 04 56 52 06 57

Running title: AB inhibits dendritic actin dynamics

Number of words (excluding abstract, bibliography and figure legends): 5746

Abstract: 249 words

Abstract

Alzheimer's disease is associated with dysfunction and loss of synapses, resulting in progressive cognitive decline. Amyloid- β (A β) peptides are now recognized to exert a causative role in the pathology. We applied A β oligomers to hippocampal slices or cultured primary cortical neurons and observed a blockade of long-term potentiation and reduced synaptic-driven calcium responses, respectively. Importantly, these disruptions were accompanied by a specific accumulation of A β oligomers within postsynaptic sites of excitatory synapses. Given that dendritic spines are enriched in filamentous actin, we investigated the effects of A β oligomers on the actin cytoskeleton. Using F-actin immunoprecipitation assay, we demonstrated that low molecular weight A β oligomers directly interact with F-actin in cultured cortical neurons exposed to extracellular A β oligomers as well as in brain tissue from APP/PS1-21 transgenic Alzheimer's disease model mice. Cell-free assays confirmed that there are no required protein partners for A β oligomers to bind F-actin. A β oligomers binding to F-actin decreases actin depolymerisation rate in a concentration-dependent manner and leads to abnormal F-actin bundle formation as observed by confocal and atomic force microscopies. Finally, A β oligomers blocked activity-induced insertion of AMPA receptors at the postsynaptic density, a phenomenon central to synaptic plasticity that relies on actin dynamics. Together our data highlight an important and early event in A β -driven synaptotoxicity whereby A β oligomers penetrate into the post-synaptic site of excitatory synapses and uncouple actin cytoskeletal dynamics from synaptic strength. We conclude that targeting of the actin cytoskeleton in excitatory synapses by A β oligomers may underlie early synaptic dysfunction and cognitive impairment that characterize AD.

Keywords: amyloid beta, synaptic plasticity, Alzheimer's disease, excitatory neurotransmission, NMDA

Introduction

One of the pathological hallmarks of AD is the abnormal accumulation of amyloid- β ($A\beta$) within the cerebral parenchyma as well as in vascular walls (Glenner and Wong, 1984). Originally, the amyloid cascade hypothesis of AD was based on the assumption that cognitive impairment was caused by the senile plaques present in the brain parenchyma (Hardy and Higgins, 1992). However, alterations of synaptic function as well as cognitive deficits are observed in transgenic mouse models of AD prior to the appearance of senile plaques (Harris and Stevens, 1989; Mucke et al., 2000). Before reaching the fibrillar state observed in senile plaques, $A\beta$ assembles into soluble oligomers (Walsh et al., 1997). Several studies highlighted the pathogenic role of $A\beta_0$ in AD (Rowan et al., 2007; Viola et al., 2008). Indeed, the levels of $A\beta_0$ strongly correlate with the extent of synapse loss and cognitive impairment observed in AD patients (Gong et al., 2003; McLean et al., 1999). Furthermore, injection of $A\beta_0$ purified from AD transgenic mice transfers cognitive disruption to naïve animals (Cleary et al., 2005; Lesné et al., 2006). $A\beta_0$ exert numerous biological effects on excitatory neurotransmission ranging from inhibition of long-term potentiation (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 2002) and facilitation of long-term depression (Li et al., 2009) to alteration of glutamate receptor trafficking (Snyder et al., 2005). Together, these reports established a preferential link between $A\beta_0$ and the alteration of glutamatergic neurotransmission (Palop and Mucke, 2010). Dendritic spines are the main postsynaptic sites for excitatory connections between neurons. Their volume and number are controlled by synaptic activity (Harris and Kater, 1994; Sorra and Harris, 2000) and this structural plasticity requires the actin cytoskeleton that is particularly enriched in spines. Fluorescence-based experiments have shown that a shift of actin equilibrium towards polymerization occurs in the spine head during long term potentiation (Okamoto et al., 2004) suggesting that this regulation of actin provides a substrate for synaptic plasticity. Thus, actin dynamics and synaptic strength are intimately linked and, together, yield the excitatory postsynaptic response. Indeed, the actin driven morphological changes of the post synaptic membrane are coupled to receptor trafficking providing a larger surface for accommodating synaptic receptor number. Among the ionotropic glutamate receptors involved in excitatory synaptic transmission, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA) play a pivotal role during synaptic potentiation by trafficking to the post-synaptic site of excitatory synapses (Gu et al., 2010).

In the present study, we investigated the functional modifications driven by $A\beta_0$ at excitatory synapses in hippocampal slices and in cultured primary cortical neurons. We studied neuronal

localization of $A\beta$ and focused our investigation on spine heads and the actin dynamics therein. According to our results, we propose a model in which $A\beta_0$ directly inhibit the dynamic nature of actin at postsynaptic sites of excitatory synapses, thereby disrupting postsynaptic responses and synaptic plasticity.

Results

***Aβ* oligomers inhibit LTP in the CA1 region of hippocampal slices.**

To understand the influence of Aβ conformations on synaptic function, we prepared oligomeric or fibrillar forms of human Aβ₁₋₄₂. By applying a method previously described (Stine et al., 2003), we produced solutions that displayed all the expected characteristics of Aβ_o or Aβ_f (Fig. 1a). We then evaluated the functional consequences of Aβ application on synaptic plasticity in hippocampal slices. First, high frequency stimulation (HFS, 2x100 Hz) produced a large glutamate release and induced a robust long-term potentiation (LTP) in control slices ($149.8 \pm 9\%$, n=9 slices from 8 mice; Fig. 1d). Aβ_o (100 nM) applied for 20 min before and during HFS induced a long-lasting blockade of LTP ($108.9 \pm 7\%$, n=9 slices from 9 mice; p=0.0016; Fig. 1d). Similar experiments performed with Aβ_f did not induce any significant change in LTP ($147.5 \pm 10\%$, n= 6 slices from 6 mice, data not shown in figure). We also examined the basal synaptic transmission by analysing the size of field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) before and after Aβ application (100 nM for 20 min). The amplitudes of fEPSPs measured as a function of stimulation intensities were not affected by either Aβ_o (Fig. 1b) or Aβ_f (data not shown), thereby suggesting that modifications of AMPA receptor-mediated responses and neuronal excitability did not occur. Paired-pulse facilitation (PPF), a short lasting enhancement in synaptic strength, essentially mediated by presynaptic calcium-dependent mechanisms (Kamiya and Zucker, 1994), was not altered by application of Aβ_o ($151.1 \pm 10\%$ in control vs $141.2 \pm 8\%$ in Aβ_o, n=11 slices from 10 mice; p=0.1, *ns*; Fig. 1c) or Aβ_f (data not shown). The lack of effect of Aβ_o on PPF suggests that Aβ_o-induced blockade of LTP is not mediated by presynaptic mechanisms. Together, these data suggest that Aβ_o reduce synaptic plasticity by selectively disrupting postsynaptic functions of excitatory synapses.

***Aβ_o* concentrate in the actin-enriched postsynaptic density fraction**

Given the selective impact of Aβ_o on the functionality of the postsynaptic compartment, we investigated whether exogenous Aβ_o selectively target the postsynaptic density (PSD) fraction. After exposing cultured primary cortical neurons to Aβ_o at 37°C or 4°C, we performed a synaptosomal fractionation to separate a “PSD-enriched” and a “non-PSD-enriched” fraction. The synaptosome fraction was characterized by performing western blot of glutamatergic receptor subunits (GluN1, GluN2A, GluN2B and GluA1) and actin. While actin was enriched in the PSD fraction (Fig. S1a and b), Western blot analysis of glutamatergic receptors displayed

a net separation of receptor expression in the PSD fraction versus the non-PSD fraction. These results validate the fractionation protocol that we used to segregate pre- and post-synaptic compartments. Western blot analysis revealed the presence of low molecular weight (LMW) $A\beta_o$ only in the PSD-enriched fraction (Fig. 2a). This accumulation was not present when incubation was performed at 4°C (Fig. 2a). Dendritic spines are particularly enriched in actin cytoskeleton as revealed by the co-localization of the fluorescence observed following transfection with cDNA encoding for yellow fluorescent protein-tagged postsynaptic density 95 protein (YFP-PSD95) and with a cDNA encoding for a 17-amino-acid peptide, RFP-Lifeact (Riedl et al., 2008) which stained F-actin (Fig. 2b). Next, we used fluorescein isothiocyanate-tagged $A\beta$ (FITC- $A\beta$) oligomers to confirm the postsynaptic localization of $A\beta_o$. After a 15 min incubation of FITC- $A\beta_o$ or FITC- $A\beta_f$ on primary cortical neurons cultures, we removed the excess of FITC-tagged peptide with successive washes (Fig. 2c). By using an extraction protocol that preserves actin cytoskeleton integrity, we measured a significant increase in the fluorescence intensity in the triton-resistant fraction (i.e. the fraction enriched in polymerized/F-actin) extracted from neurons exposed to FITC- $A\beta_o$ ($n=5$, $p<0.001$, Fig. 2d). The increase of fluorescence intensity in the triton-resistant fraction after $A\beta_o$ exposure was significantly reduced when FITC- $A\beta_o$ incubation was performed at 4°C indicating the requirement of active processes (Fig. 2e). We observed no difference in fluorescence in neither triton-sensitive nor triton-resistant fractions following exposure to FITC- $A\beta_f$ (Fig. 2d).

Actin distribution in spines and dendrites is modified following $A\beta_o$ exposure

Given the localization of $A\beta_o$ in the actin-enriched PSD fraction, we questioned whether $A\beta_o$ perturb neuronal actin distribution. We transfected neurons with YFP-actin and analyzed its localization after exposure to $A\beta_o$ or $A\beta_f$. In transfected neurons, we observed homogeneous distribution of the fluorescence in primary dendrites where actin is present at high levels in an unpolymerized state and a punctuated fluorescence in spines, suggesting the presence of polymerised actin. Following $A\beta_o$ exposure, punctuated fluorescence was observed within primary dendrites (Fig. 3a,b). $A\beta_f$ did not alter YFP-actin distribution (Fig. 3c). By exposing neuronal cultures to a depolymerizing or polymerizing drug, latrunculin B or jasplakinolide respectively, we studied whether modification of YFP-actin fluorescence observed after $A\beta_o$ exposure was due to an increase in globular actin (G-actin; unpolymerized state) or F-actin. As expected latrunculin incubation transformed mushroom-type spines into filopodia-like thin processes through the depolymerization of the F-actin pool localized in the spine head (Fig. 3d).

This result supports the pivotal role of F-actin in shaping dendritic spine heads. At the opposite, jasplakinolide treatment induced accumulation of YFP-actin within dendrites similar to that observed following A β _o exposure (Fig. 3e). When we performed signal distribution analysis in primary dendrites following these treatments, we observed an increased variance indicating a heterogeneous distribution of the fluorescence signal only when neurons are exposed to A β _o and jasplakinolide (fig 3f). These modifications in fluorescence distribution of YFP-actin led us to evaluate the impact of A β _o on actin dynamics.

A β _o interact with neuronal F-actin

Given the localization of A β _o in the actin-enriched PSD fraction, we hypothesized that A β _o may interact directly with F-actin. To test this, we exposed cultured neurons to A β _o or A β _f for 15 min at 37°C and subsequently washed the cultures extensively to remove A β excess before F-actin precipitation. Phalloidin, a toxin that specifically binds to F-actin provides a convenient tool to identify actin-interacting proteins in living cells. By using a molecular complex composed of biotin-phalloidin attached to streptavidin-tagged magnetic beads, we selectively precipitated neuronal F-actin pools. A β immunoblots after precipitation revealed LMW A β _o interaction with F-actin (Fig. 4a). This co-precipitation of A β _o with F-actin was dramatically reduced by a pre-treatment with latrunculin B (10 μ M) for 45 min. Furthermore, no interaction was observed when A β _o incubation was performed at 4°C (Fig. 4b). These results demonstrate that LMW A β _o penetrate into the intracellular compartment by active mechanisms and bind to F-actin.

Next, we studied whether the interaction of A β _o and F-actin is present in animal models of AD. We chose to perform our investigation on a transgenic mouse model of AD (APP/PS1-21 mice) carrying amyloid-related mutations (APP_{swedish} and PS1_{L166P} mutations). By using the phalloidin precipitation protocol on brain extracts, we revealed an interaction of A β _o with F-actin in the cortex of these transgenic mice (Fig. 4c). To determine if the interaction between A β _o and F-actin requires protein partners, we performed the co-precipitation experiment on purified G-actin or F-actin in the presence of A β _o. The results validate our previous observation that LMW A β _o co-precipitate only with F-actin and indicate that interaction of A β _o with F-actin does not require any accessory proteins. Neither G-actin nor A β _o precipitated following the incubation with biotin phalloidin (Fig. 4a).

We then used a cell-free assay based on pyrene-labelled actin to determine the consequences of A β _o interaction with F-actin on actin polymerization/depolymerization kinetics. Polymerization

was initiated by the addition of an actin polymerization buffer to a G-actin solution. The data produced a sigmoidal curve that characterizes the polymerization process. Addition of $A\beta_o$ did not modify actin polymerization kinetics (control, $n=4$; $A\beta_o$, $n=3$; Fig. 4d). Next, we induced depolymerization by a 10-fold dilution of preformed pyrene-labelled actin filaments. Addition of $A\beta_o$ (at 0.1, 0.5, 1 and 5 μM) reduced the depolymerization rate in a concentration-dependant manner (Fig. 4e, f). We further studied actin filament organization in the presence of $A\beta_o$ by atomic force microscopy and by confocal fluorescence microscopy of FITC-phalloidin tagged F-actin. Both techniques revealed the presence of extensive F-actin bundles in the presence of $A\beta_o$ (Fig. 4g). These results indicate that $A\beta_o$ promote F-actin stabilization and bundle formation and inhibit depolymerisation.

***A β_o* and the actin-stabilizing drug, jasplakinolide, alter synaptic calcium responses**

Since $A\beta_o$ are present in the postsynaptic site, we hypothesized that modification of spine actin dynamics towards F-actin is responsible for the functional modifications observed. In order to validate this hypothesis, we measured the effects of $A\beta_o$ and $A\beta_f$ (100 nM) on the calcium rises induced by activation of synaptic receptors triggered by the co-application of bicuculline, a GABA_A receptor antagonist, and 4-aminopyridine, a weak potassium-channel blocker, on cultured primary cortical neurons. While synaptic responses are very stable in control conditions (Fig. S2), we observed that $A\beta_o$ application for 15 min reduced synaptic-driven Ca^{2+} responses by 42% ($p<0.001$, Fig. 5a,b). $A\beta_o$ exposure did not alter AMPARs-driven Ca^{2+} response (data not shown) suggesting an effect specific to NMDARs. Incubation with $A\beta_f$ did not modify synaptic-driven calcium responses significantly ($p=0.84$, Fig. 5c,d). After confirmation of $A\beta_o$ -mediated disruption of synaptic responsivity, we tested whether incubation of compounds that disrupt actin organisation induced a similar reduction in post-synaptic integration. Thus, we characterized the effects of 15 minutes exposures to latrunculin B (10 μM) or jasplakinolide (1.25 μM). After 15 min incubation, latrunculin B treatment promoted important actin depolymerization in spines but only stabilization of F-actin by jasplakinolide significantly modified synaptic Ca^{2+} responses (for latrunculin B, $p=0.16$; for jasplakinolide, $p<0.001$) (Fig. 5e-h).

***A β* oligomers modify actin dynamics in primary neurons**

The post-synaptic actin cytoskeleton is highly dynamic due to both constant turnover of F- and G-actin and rapid diffusion between the spine head and the dendritic shaft. Subtle modifications

of the actin treadmill rapidly disrupt the equilibrium toward F- or G-actin making the actin cytoskeleton a compelling substrate for synaptic plasticity. We used fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) of YFP-actin to examine the actin dynamics in dendritic spines of neurons exposed to $A\beta_0$ (Fig. 6a). This technique allowed the identification and quantification of the different actin pools within the spine head. In brief, the mobile pool of actin represents unassembled actin monomers, the dynamic pool is the F-actin that turns over during the course of the experiments and the stable pool is F-actin that does not turnover in that same time frame. The YFP-actin signal that rapidly recovered after photobleaching corresponds to the highly mobile actin pool. The difference between the minimum fluorescence after photobleaching and the plateau fluorescence upon recovery represents the dynamic actin pool. Finally, the difference between maximum fluorescence and the plateau value represents the stable actin pool (Fig. 6b). In control conditions, we observed approximately 80% recovery of the YFP-actin signal in spines after multiple bleaching episodes (Fig. 6a,b). In dendritic spines, $66.3 \pm 2.7\%$ of total actin was in a dynamic state; $18.1 \pm 3.1\%$ in stable form and $15.5 \pm 0.9\%$ was highly mobile (Fig. 6c,d). The cell-permeant F-actin-stabilizing compound, jasplakinolide, completely prevented the recovery of the YFP-actin signal in spines after photobleaching by converting mobile and dynamic actin into a stable form ($86.1 \pm 3.6\%$ vs. $18.1 \pm 3.2\%$ in control conditions; $p < 0.0001$, Fig. 6b-d). When we exposed neurons to 100 nM of $A\beta_0$ for 15 minutes, FRAP values were substantially modified. Whereas $A\beta_f$ did not affect actin dynamics, $A\beta_0$ converted $40.4 \pm 3.7\%$ of total actin into a stable pool (vs. $18.1 \pm 3.1\%$ in control conditions; $p = 0.001$) and left only $46.6 \pm 3.2\%$ of actin for dynamic turnover (vs. $66.3 \pm 2.7\%$ in control conditions; $p = 0.001$, Fig. 6b-d).

It is now widely accepted that neuronal activity regulates spine actin turnover as demonstrated by the rapid and persistent shift of actin equilibrium toward F-actin induced by a tetanic stimulation (Okamoto et al., 2004). Actin stabilization participates in AMPA receptors enrichment at the PSD to create synaptic plasticity (Geinisman et al., 1991). Given the stabilizing effect of $A\beta_0$ on actin cytoskeleton, we investigated whether neuronal activation was able to induce AMPA receptor insertion and actin stabilization in the presence of $A\beta_0$. For this purpose, YFP-actin-expressing neurons were exposed to 100 nM $A\beta_0$ for 15 min before synaptic excitatory neurotransmission was triggered by a 5 minute application of bicuculline (BiC, 50 μ M) and 4-aminopyridine (4-AP, 2.5 mM). As expected, in control conditions BiC/4AP exposure induces a stabilization of $38.9 \pm 4.4\%$ of total actin (Fig. 6b-d) (vs. $18.1 \pm 3.2\%$ in untreated control conditions; $p = 0.001$). When neurons were exposed to $A\beta_0$, neuronal activation

did not induce any additional stabilization of the actin cytoskeleton ($34.5 \pm 5.2\%$ of stable actin in BiC/4AP+A β_0 compared to $40.4 \pm 3.7\%$ in A β_0 alone, $p=0.44$, Fig. 6b-d). Furthermore, presence of A β_0 prevented the stimulation-induced AMPA receptor insertion at the PSD as determined by Western blot analysis of fractionated samples from cultured neurons exposed to A β_0 (100 nM) for 15 min before, and through the duration of, a 15 min exposure to BiC/4AP (Fig. 6e). Together these results indicate that A β_0 uncouple actin dynamics from neuronal activity in dendritic spines thereby limiting synaptic plasticity.

Discussion

Over the past decade, research on AD focused on the impact of different A β conformations responsible for the cognitive impairment that characteristic of the disease (Lambert et al., 1998). In this context, several reports demonstrated that A β_0 could be responsible for cognitive decline as their presence in AD brain is correlated with memory deficits and spine loss (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999). Gross spine loss is observed in AD patients, transgenic models of AD and following A β_0 exposure; however, our findings represent a very early and important synaptotoxic disruption that precedes complete spine loss or retraction. Our study demonstrates that low molecular weight A β_0 penetrate into the post synaptic compartment of excitatory synapse and directly bind to filamentous actin thereby re-organizing the F-actin cytoskeleton and consequently inhibiting actin-driven postsynaptic plasticity.

As reported in previous studies using hippocampal slice preparations we observed that exogenously applied A β_0 disrupt excitatory synaptic transmission as demonstrated by A β_0 -induced blockade of LTP (Walsh et al., 2002). Here we report that this disruption of synaptic plasticity was due to the lowering of excitatory postsynaptic integration. Indeed, since paired-pulse facilitation (PPF, a short lasting enhancement of synaptic strength essentially mediated by presynaptic calcium-dependent mechanisms (Kamiya and Zucker, 1994)) and the amplitudes of fEPSPs were not affected by A β_0 , the disruption of synaptic plasticity is not likely to be mediated by perturbation at the presynaptic level or by affecting AMPA receptor-mediated responses. Supporting a post-synaptic effect, we found that A β_0 selectively penetrate into dendritic spines and drive a re-organization of the actin cytoskeleton, consequently altering actin stability and ultimately disrupting synaptic function. Exposure to A β_0 , but not A β_f affects spine function and only A β_0 localize to the post-synaptic compartment. These findings are in accordance with accumulating evidence that points to a significant role of intraneuronal A β in triggering the pathological cascade of AD. Transgenic mouse models of AD display synaptic dysfunctions at developmental stages when intraneuronal A β accumulation preceded extracellular plaque deposition (Bayer and Wirths, 2008). We also demonstrate accumulation of A β_0 in the PSD-95 enriched synaptosomes of cortical neurons both *in vitro* and *in vivo* from tissue samples of transgenic AD mice.

Interaction with the actin cytoskeleton implies that A β_0 penetrate into the neuronal cytoplasm. We showed by using both FITC-A β_0 and phalloidin precipitation assay that A β_0 cross the neuronal membrane and selectively target the dendritic actin cytoskeleton. This finding is consistent with a recent study that demonstrates the ability of A β_0 to cross the neuronal plasma

membrane and to accumulate in the cytoplasm (Hu et al., 2009). Further studies will be necessary to identify the route of entry into the spine.

Dendritic spines that contain PSD-95 are the main postsynaptic sites for excitatory synapses. They can change their morphology dynamically to take various shapes categorized as: stubby, thin or mushroom type. This morphological plasticity is directly coupled with actin cytoskeleton rearrangements by which dendritic spines process incoming synaptic signals. A branched actin filament network is present within dendritic spines and contains highly localized foci of actin polymerization. This network, a portion of which contacts the PSD, is present throughout the spine head and a pool of filaments reside in the spine neck (Frost et al., 2010; Korobova and Svitkina, 2010). As well, it has been shown that synaptic activity regulates actin turn over in spines. The functional and morphological plasticity are directly coupled with rearrangements of the actin cytoskeleton. Synaptic activity directly promotes stabilization of F-actin (Star et al., 2002) and induces AMPA receptor insertion at the PSD (Gu et al., 2010). While we observed stabilization of actin induced by synaptic activation or $A\beta_o$ exposure, the mechanisms involved in each condition are different. Whereas activity-induced actin stabilization promotes AMPA receptor insertion at the postsynaptic site, actin stabilization induced by $A\beta_o$ does not affect AMPA receptors under resting conditions and abolishes insertion into the PSD following synaptic activation. The direct interaction between $A\beta_o$ and F-actin promotes reorganization of the synaptic actin cytoskeleton into bundles and reduces the rate of F-actin depolymerisation, which uncouples actin treadmill kinetics from synaptic activity and ultimately results in decreased efficiency of excitatory neurotransmission. That is, $A\beta_o$ disconnect actin-mediated receptor insertion from synaptic activity leading to impaired plasticity at the spine level. Importantly, the effects of $A\beta_o$ exposure were shadowed by the actin-stabilizing compound, jasplakinolide, which indicate that direct disruption of the actin cytoskeleton dynamic is sufficient to cause significant disruption to synaptic responses and plasticity. These results are in accord with previous studies showing actin polymerization and disassembly are both necessary to maintain spine morphology as well as physiological (Hotulainen et al., 2009; Kim and Lisman, 1999) and pathological (Chen et al., 2012; Durand et al., 2012) synaptic transmission.

In conclusion, $A\beta_o$ are now considered a major contributor to the neuronal disturbances observed in the early phases of AD (Lesné and Kotilinek, 2005). Actin accumulates in rod-like structures in the frontal cortex and hippocampus of AD patients (Minamide et al., 2000); thus, the research community has speculated that perturbation of the actin cytoskeleton may

participate in the pathogenesis of AD. Our study reveals that by disrupting the ability of the dendritic actin cytoskeleton to respond to synaptic stimuli, $A\beta_o$ reduce the ability of spines to integrate excitatory neurotransmission and abolish synaptic plasticity. This selective deterioration of postsynaptic responses may be responsible for the imbalance of excitatory neurotransmission observed in animal models of AD. Limiting the impact of $A\beta_o$ on actin dynamics may represent a new therapeutic target for preventing the neurotransmission deficits that characterize the early stages of AD.

Figures

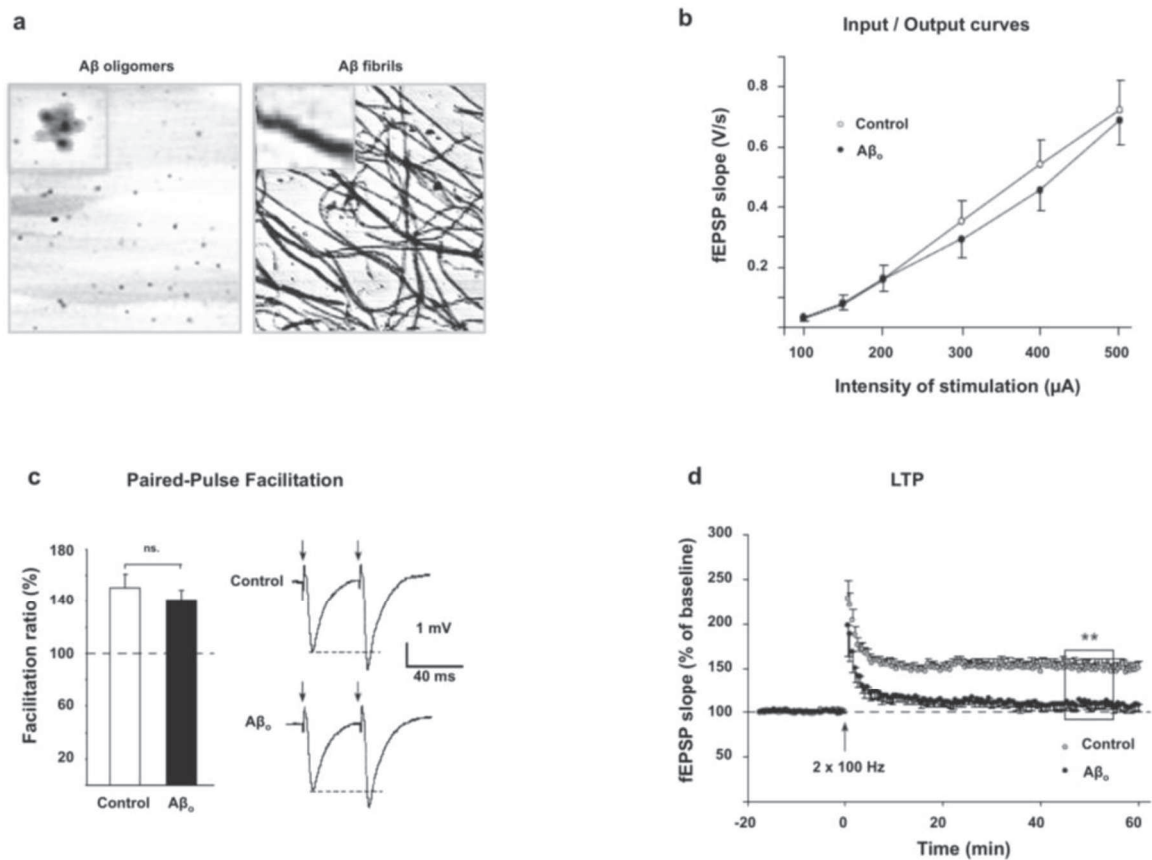


Figure 1: Effect of A β oligomers on CA1 hippocampal neuron electrophysiology. **a**, Visualization by atomic force microscopy of A β conformations following oligomerization and fibrillogenesis protocols. Images 3 μ m x 3 μ m. Insets represent higher magnification images of A β oligomers and fibrils. **b**, Plot of the mean fEPSPs slope of AMPA receptor-mediated synaptic response against the stimulus intensity in hippocampal slices before (control, n=10, open circles) and during application of A β_0 (A β_0 , n=10, closed circles). Responses in both populations are not statistically different. **c**, Comparison of the average paired-pulse facilitation (PPF) of the fEPSPs for inter-stimulus intervals of 40 ms before (control) and 20 min after A β_0 application (A β_0 , one-way ANOVA, *ns.* indicates $p=0.1$; error bars are \pm SEM, n=11). Right traces show individual fEPSPs before (control) and 20 min after A β application (A β_0). **d**, Time course of LTP in control slices (open circles) and in slices receiving 100 nM A β_0 for 20 min before the stimulation and during the stimulation (closed circles). LTP is expressed as a percent change in fEPSPs slope across time. After 15 min of baseline, high frequency stimulation was applied (HFS, 2 x 100 Hz spaced by 20 s). Statistically significant differences from control were calculated during the period indicated by the square (ANOVA; ** indicates $p=0.001$; error bars represent \pm SEM; n=9).

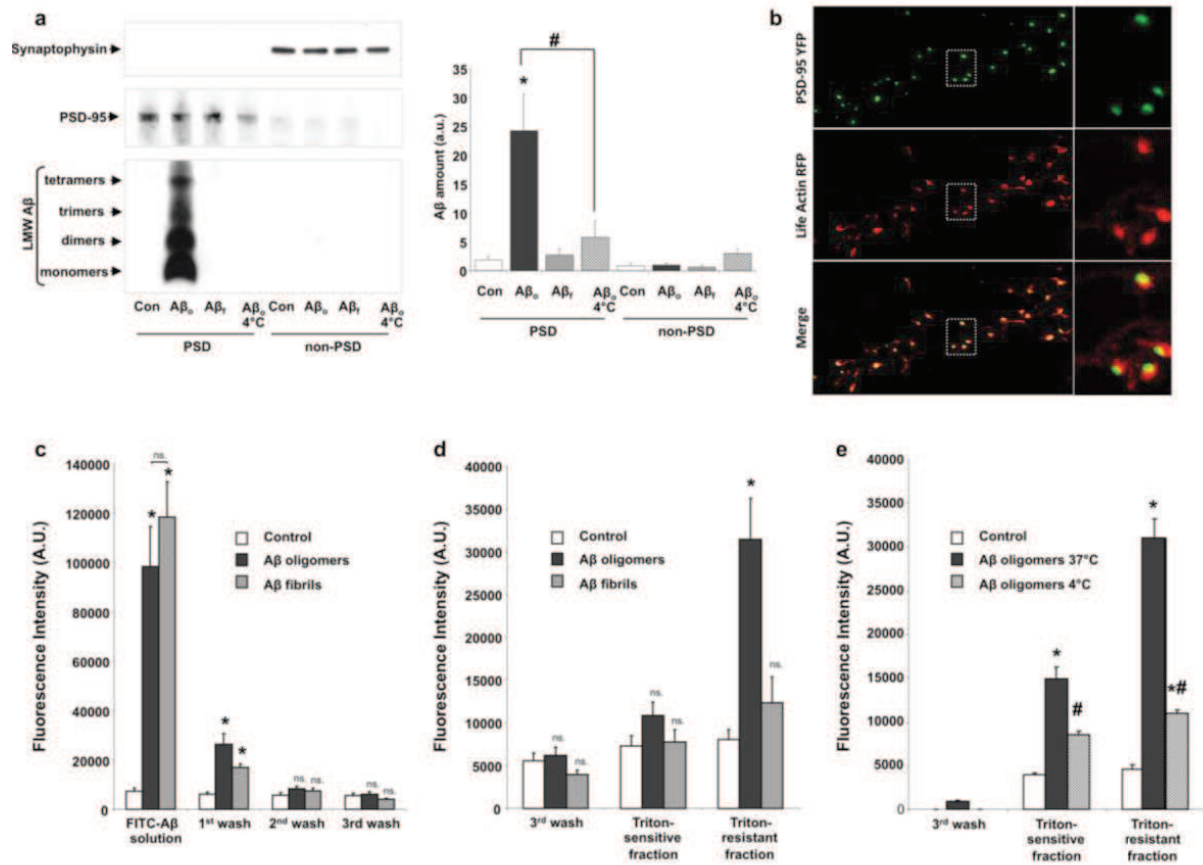


Figure 2: Exogenous Aβ_o penetrate into the neuronal compartment and accumulate in the F-actin-enriched PSD fraction. **a**, Left panel: representative anti-synaptophysin, anti-PSD-95 and anti-Aβ (4G8 clone) immunoblots on subcellular PSD and non-PSD fractions after incubation for 15 min of 1 μM Aβ_o or Aβ_r at 37°C or at 4°C when mentioned. The synaptosomal fractionation was performed after 5 consecutive washes. Right panel: bar graphs showing the quantification by densitometric analysis of the Aβ-related signal. Statistically significant differences were calculated (* indicate significant difference from the control, p=0.004; # indicate the significant difference between Aβ_o and Aβ_o 4°C, p=0.04; error bars represent ± SEM; N=4). **b**, Confocal micrographs of dendritic segments from cortical neurons co-expressing RFP Lifeact (red) and YFP-PSD-95 (green) cDNAs (scale bar=10 μm). Areas indicated by dashed rectangles are enlarged areas shown at the right of each image. **c-e**, Bar graphs showing the quantification of FITC-Aβ-related fluorescence intensity. **c**, Cortical neurons were exposed for 15 min to 1 μM FITC-Aβ_o or FITC-Aβ_r and washed three times in a cytoskeleton stabilization buffer. Fluorescence intensity from the FITC-Aβ solutions as well as each wash solution was measured (N=5). **d**, The triton-sensitive fraction was extracted with cytoskeleton stabilization buffer supplemented with 0.5% triton. The remaining triton-resistant fraction was extracted with SDS and FITC-Aβ-related fluorescence intensity was measured in both fractions (N=5). **e**, Cortical neurons were treated with FITC-Aβ_o at either 37°C or at 4°C and after extraction of the sensitive- and resistant-triton fractions, the FITC-Aβ_o-related fluorescence intensities were compared (N=3). In **c-e**, statistically significant differences were calculated (* indicates significant difference from control, p<0.001 and *ns.* indicates no significant difference, p>0.5; # indicates a significant difference between Aβ_o and Aβ_o 4°C, p<0.001; error bars represent ± SEM).

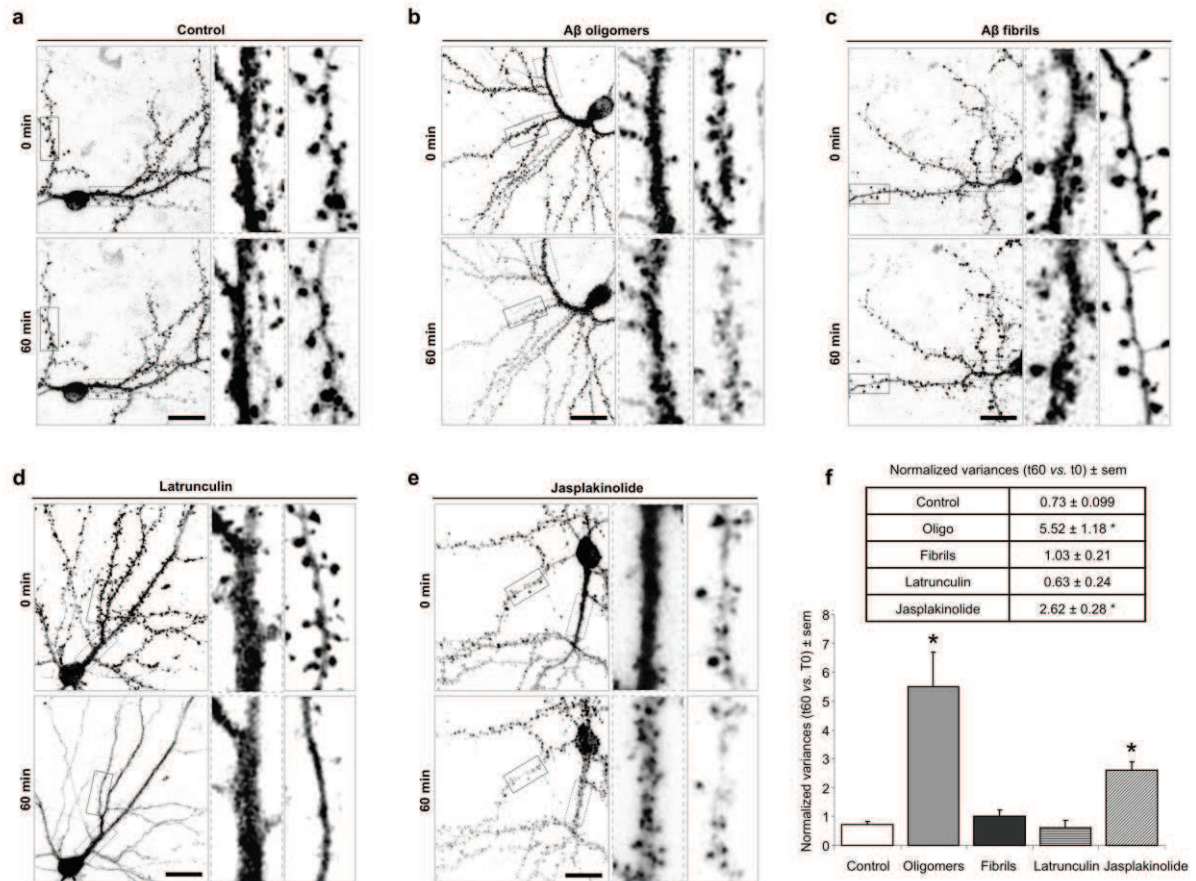


Figure 3: Aβ oligomers alter neuronal actin localization. **a-e**, Low and high magnification photomicrographs of YFP-actin expressing cortical neurons. For high magnification, left and right images show primary (dashed rectangles) and secondary (solid rectangles) dendrites respectively. **a-e**, Cortical neurons were treated with either control buffer (**a**), Aβ_o (**b**), Aβ_f (**c**), latrunculin B (10 μM, **d**) or jasplakinolide (1.25 μM, **e**) at RT for 1 h to minimize time specific issues on the pharmacological activity of actin polymerizing or depolymerizing compounds. For low magnification images, scale bars=20 μm; for high magnification, images correspond to primary (left) and secondary (right) dendritic segment of 20 μm length. **f**, Normalized variance of the fluorescence signal obtained at 0 and 60 min in the different experimental conditions, statistical analysis was performed by ANOVA followed by a Bonferonni's multiple comparison test. * indicates significant difference from control.

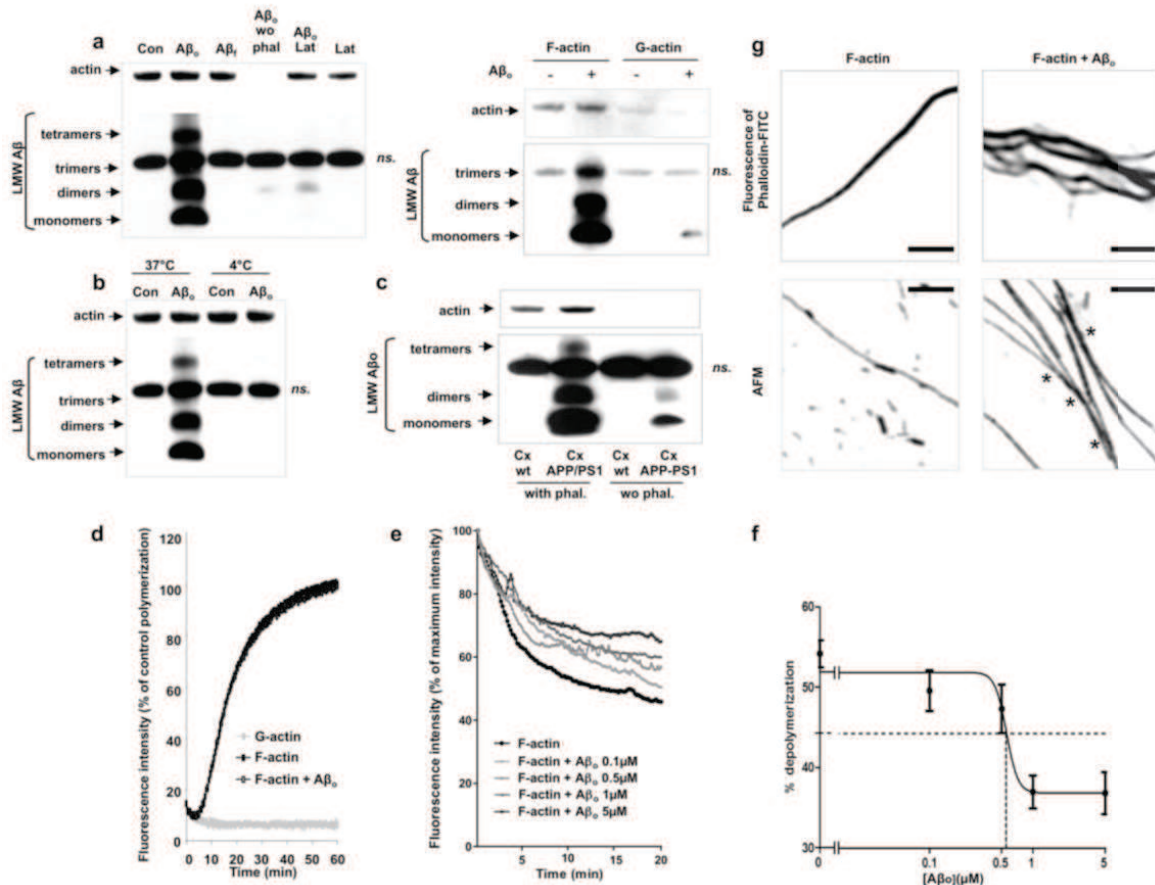


Figure 4: A β_0 directly interact with neuronal F-actin. **a**, Left panel: Representative anti-actin and anti-A β (4G8 clone) immunoblots from neuronal cell lysates after incubation with A β_0 and A β_r (1 μ M) for 15 min at 37°C followed by five consecutive washes and precipitation of F-actin with the molecular complex Dynabeads[®]-streptavidin-biotin-phalloidin. When indicated, neurons were pre-treated for 45 min before A β application with 20 μ M latrunculin B (N=3). Right panel: Representative anti-actin and anti-A β immunoblots after incubation of 2.32 μ M purified G-actin or F-actin for 30 min at RT with A β_0 (2.3 μ M) followed by precipitation of F-actin. **b**, Representative anti-actin and anti-A β immunoblots after incubation of A β_0 (1 μ M) at either 37°C or 4°C followed by five consecutive washes and precipitation of F-actin (N=3). **c**, Representative anti-actin and anti-A β (4G8 clone) immunoblots from cortical brain tissues of either 10 months-old APP-PS1 mice or age-matched wild-type mice. In **a**, **b** and **c**, *ns.* indicates non-specific bands corresponding to contaminating monomers of streptavidin obtained after denaturation. In **a** and **c**, “wo phal” indicates that F-actin precipitation experiments were performed without phalloidin (negative control). **d,e**, Kinetics of polymerization (**d**) in the presence of A β_0 (5 μ M) and depolymerisation (**e**) of actin in the presence of increasing dose of A β_0 (0.1 to 5 μ M) using 10% pyrene-labelled actin (total actin concentration at 2.8 μ M). Pyrene average fluorescence intensity \pm SEM was normalized to the maximum fluorescence yielded at the end of the control polymerization (**d**) or at the beginning of the control depolymerization (**e**) (N=3 for polymerization assay; N=6 for depolymerization assay). In **d**, **e**, statistically significant differences were calculated (unpaired t-test; asterisk indicate $p < 0.05$ from $t = 2$ to 20 min; graphs represent average values \pm SEM). **(f)** A β_0 concentration plotted against the depolymerization induced by the treatment expressed in % (**g**) In the top panel, photomicrographs of FITC-phalloidin stained actin filaments (10 μ M) incubated with A β_0 (5 μ M) for 1 h at RT (scale bar = 2 μ m). In the bottom panel, actin filaments (2.3 μ M) incubated with A β_0 (5 μ M) for 1 h at RT and visualized by AFM (scale bar = 400 nm).

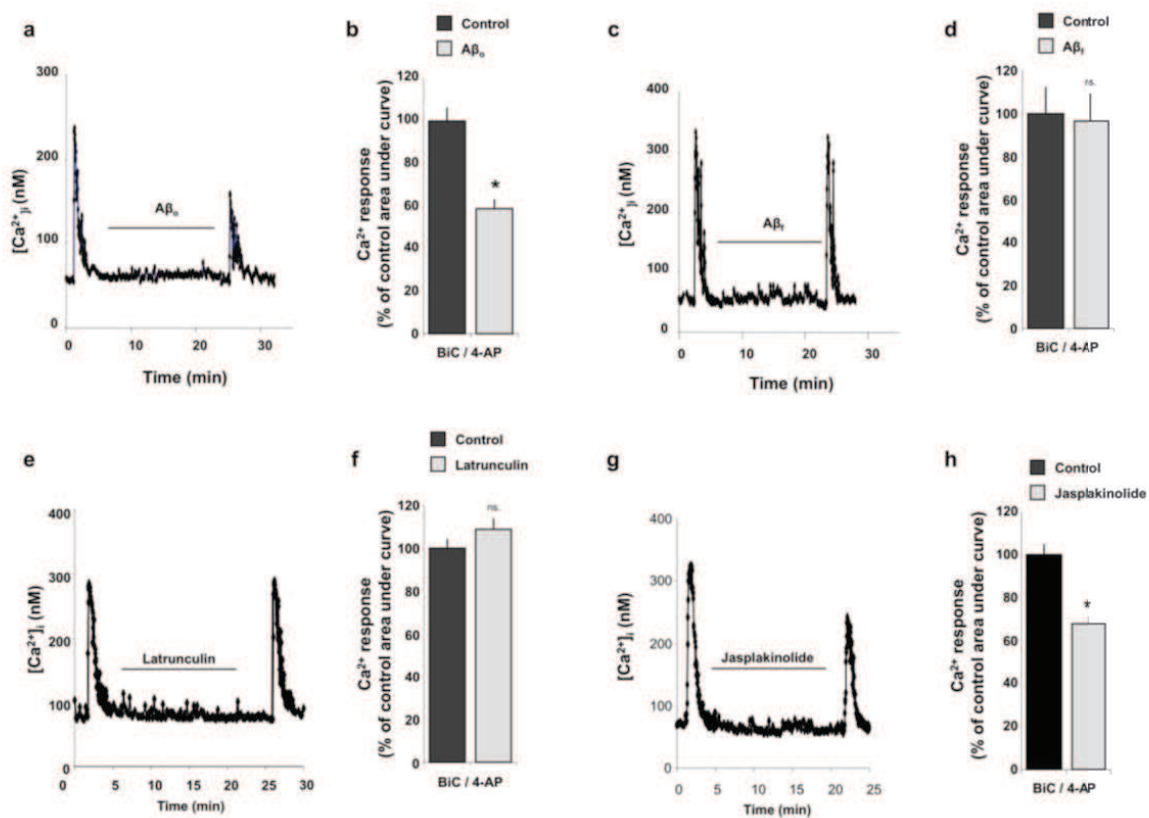


Figure 5: Aβ₀ reduce synaptic Ca²⁺ response. **a,c**, Time-lapse fura-2 Ca²⁺ imaging of synaptic activation. Representative graphs show the enhancement of synaptic excitatory neurotransmission triggered by 30 s treatment with bicuculline (BiC, 50 μM) and 4-aminopyridine (4-AP, 2.5 mM) and the effects of 100 nM Aβ₀ (**a**) or Aβ_f (**c**) treatment for 15 min. **b,d**, Bar graphs representing the quantification of the area under curve (AUC) during 2 minutes from the beginning of each BiC/4-AP-triggered response after incubation of Aβ₀ (**b**) or Aβ_f (**d**) normalized to the AUC for the preceding BiC/4-AP control response. Statistically significant differences from control were calculated (* indicates p<0.001; *ns.* indicates p=0.84; error bars represent ± SEM; Aβ_f: N=3, n=82; Aβ₀: N=3, n=81). **e,g**, Representative graphs show the enhancement of synaptic excitatory neurotransmission triggered by 30 s treatment with BiC/4-AP and the effects of 10 μM latrunculin B (**e**) or 1.25 μM jasplakinolide (**g**) treatment for 15 min. **f,h**, Bar graphs representing the quantification of the AUC during 2 minutes from the beginning of each BiC/4-AP-triggered response after incubation of latrunculin (**f**) or jasplakinolide (**h**) normalized to the AUC for the preceding BiC/4-AP control response. Statistically significant differences from control were calculated (unpaired t-test; * indicates p<0.001; *ns.* indicate p=0.841; error bars represent ± SEM; [latrunculin: N=3, n=59; jasplakinolide: N=4, n=137]).

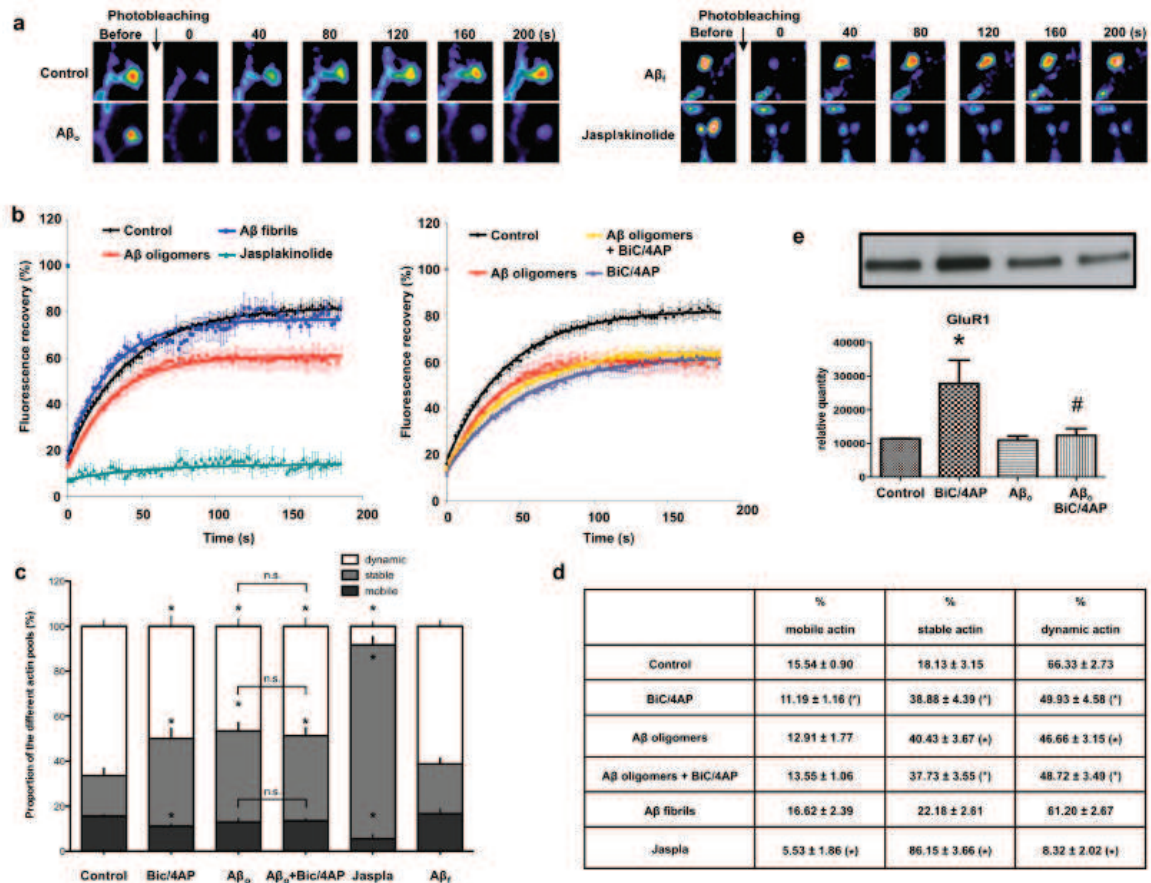


Figure 6: Aβ₀ significantly alter actin dynamics in primary neurons. **a**, In a representative FRAP experiment, dendritic spines were photobleached after exposure for 15 min to control buffer, Aβ₀ (100 nM), Aβ₄₂ (100 nM) or jasplakinolide (1.25 μM). **b**, Quantification of the YFP-actin fluorescence intensity showing the recovery kinetics of YFP-actin signal (normalized to resting level) in dendritic spines after the different treatments. Graphs represent the average values ± SEM (N_{Control}=24; N_{Aβ₀}=18; N_{Aβ₄₂}=6; N_{Jasplakinolide}=3, N_{Bic/4AP}=8, N_{Aβ₀+Bic/4AP}=8). **c**, Bar graphs representing the average proportion of each actin pool (dynamic, stable and mobile actin pools) calculated from the fluorescence recovery kinetics for each treatment (error bars represent ± SEM). **d**, Table of the average proportion of the different actin pools indicated in **c**. (values are average ± SEM). **e**, top panel is a representative immunoblot of anti-GluA1 on subcellular PSD fractions after incubation for 15 min of 100 nM Aβ₀ at 37°C and/or with Bic + 4-AP for an additional 15 min. Lower panel: densitometric quantification of 5 independent experiments. In **c,d** and **e**, statistically significant differences from the corresponding control were calculated (* indicates p<0.05; *ns.* indicates p>0.05). In **e** # indicates different from Bic+4AP group p<0.05.

Supplementary figure legend:

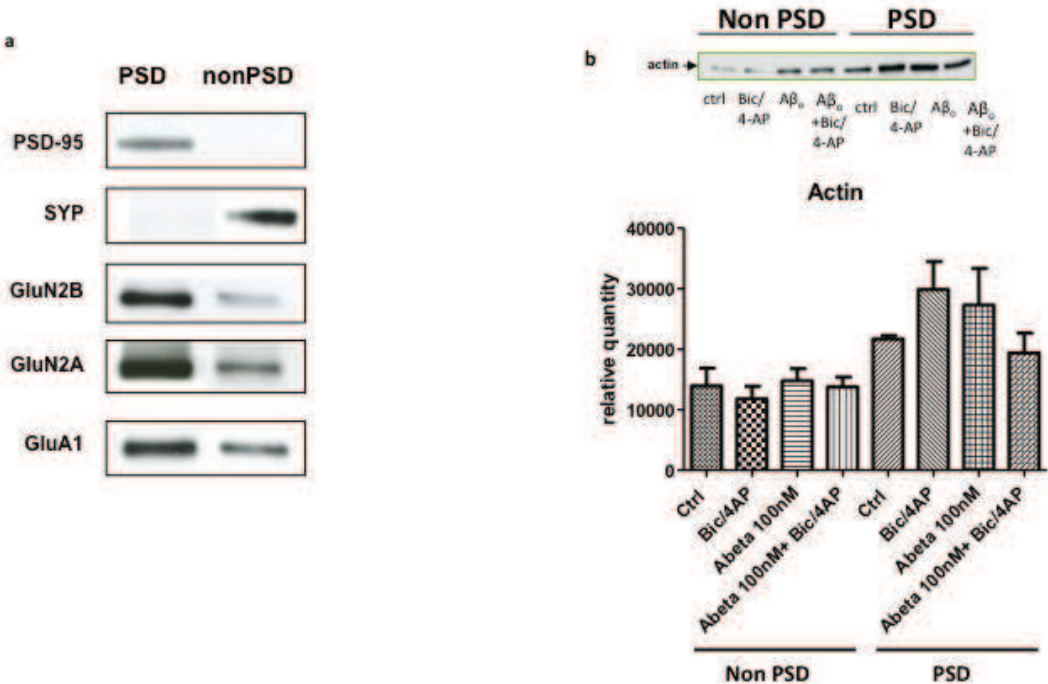


Figure S1: **a.** representative immunoblots performed on subcellular fractionation on both PSD and non-PSD fractions. The analyses fractions were characterize by performing western blot of PSD 95, Synaptophysin and glutamatergic receptors subunits (GluN2A, GluN2B and GluA1). **b.** Representative immunoblot with an antibody raised against actin performed on subcellular fractionation. Quantification of actin was performed by measuring the intensity of signals normalized to control or Bic/4AP conditions in the presence of Aβ_o. Histograms represent the mean (±SEM) of 4 independent experiments. **c.** Western blot analysis with an antibody raised against the c-terminal fragments performed on in phalloidin precipitation assay obtained in primary cortical neuronal culture following the indicated treament did not revealed any interaction of F-actin with C-terminus APP fragments.

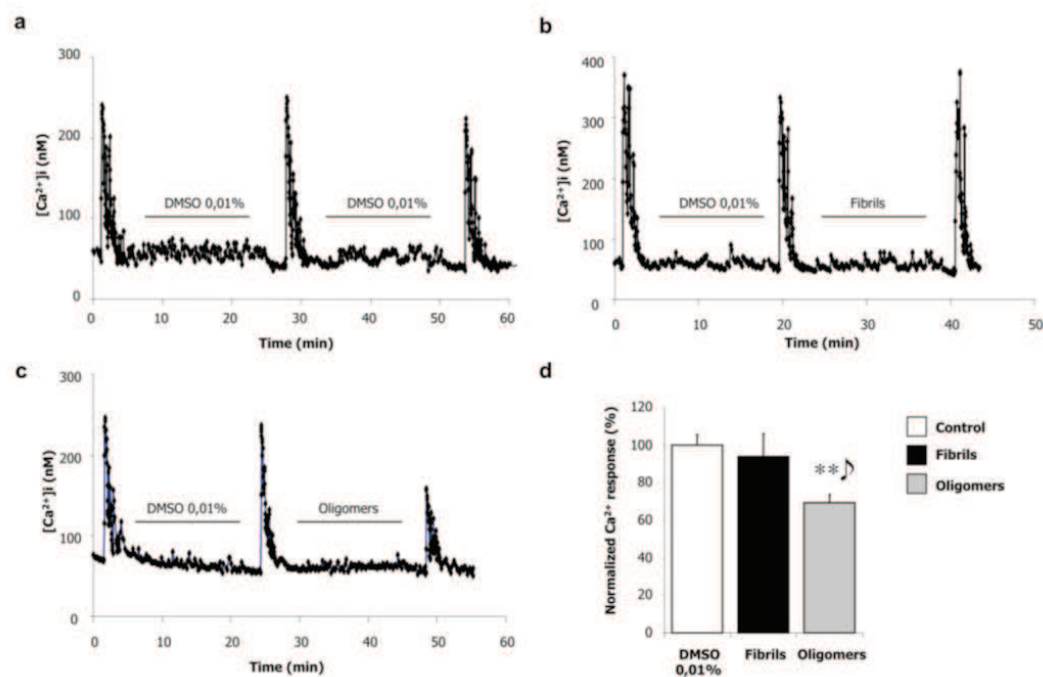


Figure S2: Impact of A β on synaptic Ca²⁺ response. Representative graph show the effects of 100 nM A β oligomers (a), fibrils (b), or vehicle (DMSO, c) during 15 min on synaptic Ca²⁺ response triggered by 30 sec bicuculline (50 μ M) and 4-AP (2,5 mM) as measured by fura-2 imaging. d. Bar Graphs represent quantification of area under curve during 2 minutes from the beginning of each synaptic response from three independent experiments \pm SEM (DMSO: N=3, n=172; A β fibrils: N=3, n=82; A β oligomers: N=3, n=81). Post A β responses were normalized to control values obtained after incubation of DMSO 0.01% during 15 min.

Supplemental information

Supplemental information includes 2 figures.

Materials & Methods

Laminin, horse serum, foetal bovine serum, fura-2/AM, Dynabeads[®]-streptavidin, biotin-phalloidin, jasplakinolide and rabbit anti-PSD95 antibody were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). (-)bicuculline methiodide, 4-aminopyridine (4-AP) were from Tocris (Bristol, UK). Human recombinant A β ₁₋₄₂ and fluorescein isothiocyanate (FITC)-A β ₁₋₄₂ were from Bachem (Weil am Rhein, Germany). N-methyl-D-aspartate, latrunculin B, FITC-phalloidin, anti-actin and secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies coupled with peroxidase were from Sigma (L'Isle D'Abeau, France). Anti-A β antibodies (4G8 clone) were from Signet Laboratories (Dedham, MA, USA). Pyrene-labelled actin, non-muscle actin, general actin buffer and polymerization buffer were from Cytoskeleton Inc. (Denver, CO, USA). YFP- and mCherry-actin coding cDNA were a generous gift from Dr Y. Hayashi. All the other chemicals were commercially available.

A β oligomerization and fibrillogenesis

Recombinant A β ₁₋₄₂ peptide and FITC-A β ₁₋₄₂ peptide were resuspended in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) to 1 mM until complete re-suspension as described in Stine *et al.*(2003b). A β oligomers (A β _o) were prepared by diluting A β to 100 μ M in ice-cold Hepes and Bicarbonates-buffered saline solution (HBBSS) with immediate vortexing and bath sonication and incubated at 4°C for 24 h on a stirring machine. A β fibrils (A β _f) were prepared by diluting A β to 100 μ M in 10 mM HCl prepared in ultrapure water with immediate vortexing and incubation at 37°C for 72h on a stirring machine.

Slice preparation and electrophysiological recordings

All experimental procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the European Communities Council Directive of the 24th of November 1986 (86/609/EEC).

Mice (6-9 month-old) were anesthetized with halothane and decapitated. The hippocampus was quickly removed and placed in cold medium containing (in mM) 124 NaCl, 3.5 KCl, 1.5 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 26.2 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 11 glucose. Slices (350 μ m thick) were prepared and placed in a holding chamber (at 27°C) at least one hour before recording. Each slice was individually transferred to a submersion-type recording chamber and immersed in medium continuously superfused and equilibrated with 95% O₂, 5% CO₂. A β peptides

solutions were applied for 20 min only during base line and stimulation through the superfusing medium. Extracellular recordings were obtained at RT from the apical dendritic layers of the hippocampal CA1 area using glass micropipettes filled with 2 M NaCl and with a resistance of 2-6 M Ω . Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were evoked by electrical stimulation of Schaffer collaterals and commissural fibres afferent to CA1 in the stratum radiatum. The intensity of the test stimuli (100 μ s duration) was adjusted to obtain 50% of the maximum fEPSP response, and applied every 10 seconds. Three successive fEPSPs were used to calculate an average slope plotted against time. *Input/Output (I/O)* curves were constructed to assess the responsiveness of AMPA/Kainate glutamate receptor (A/K) subtypes-dependent responses to electrical stimulation in slices. The amplitude of three averaged slopes of fEPSPs was plotted as a function of stimulation intensity (100 to 500 μ A). *Paired-pulse facilitation (PPF)* of synaptic transmission was induced by paired-pulse stimulation with inter-stimulus intervals (ISIs) of 40 ms. PPF was quantified by normalizing the slope of the second response by the slope of the first one. *Long-term potentiation (LTP)* was induced by the application of high frequency stimulation (HFS, two trains of 1 s at 100 Hz separated by 20 s) after baseline recording (at least 15 min or until stable). Recording was stopped during HFS so this period of time does not appear on the figure. The magnitude of synaptic plasticity was measured and average values calculated between the 45th and 55th minute after the end of the conditioning stimulus. *Data analysis:* For LTP, average values of fEPSPs slope were calculated for 10 min between 45 and 55 min after stimulation and expressed as a percentage of the baseline response (% baseline) \pm SEM

Primary cultures of cortical neurons

Mouse cortical cultures of neurons were prepared from 14- to 15-days old embryos as described previously (2001). Cerebral cortices were dissected, dissociated and cultured on 24-plates coated with 0.1mg/ml poly-D-lysine (Sigma) and 0.02mg/ml laminin in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 5% fetal bovine serum , 5% horse serum and 2mM glutamine. Cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 3-4 DIV, cytosine b-arabinoside furanoside (10 μ M) was added to inhibit proliferation of non-neuronal cells. Treatments were performed on neuronal cultures after 14 DIV.

Calcium imaging

Murine primary cortical neurons (DIV 12-14) were loaded for 45 min at 37°C with 10 μM Fura-2/AM and 0.2% pluronic acid (F-127, Invitrogen) and incubated for an additional 15 min at room temperature in HEPES and Bicarbonate-Buffered Saline Solution (HBBSS) containing (in mM) 116 NaCl; 5.4 KCl; 1.8 CaCl₂; 0.8 MgSO₄; 1.3 NaH₂PO₄; 12 HEPES; 5.5 glucose; 25 bicarbonate and 10 μM glycine at pH 7.45. Experiments were performed at room temperature with continuous perfusion at 2 ml/min with a peristaltic pump, on the stage of a Nikon Eclipse inverted microscope equipped with a 100 W mercury lamp and oil immersion Nikon 40X objective with a 1.4 numerical aperture. Fura-2 (excitation: 340/380 nm, emission: 510 nm) ratio images were acquired every 2 s with a digital camera (Princeton Instruments) using Metafluor 6.3 (Universal Imaging Corporation). Measurements were performed on neuronal cell bodies by using amplification rates that prevent saturation of the fluorescence signal and a preliminary calibration of the Ca²⁺ measurements. Fluorescence ratios (340/380 nm) were converted to intracellular Ca²⁺ concentrations using the following formula: $[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \frac{F_0}{F_s}$, where R is the ratio for observed 340/380 fluorescence ratio, R_{min} is a ratio for a Ca²⁺-free solution, R_{max} is the ratio for a saturated Ca²⁺ solution, $K_d = 135$ nM (the dissociation constant for Fura-2), F_0 is the intensity of a Ca²⁺-free solution at 380 nm, and F_s is the intensity of a saturated Ca²⁺ solution at 380 nm.

Morphological dendritic spines analysis cortical neurons:

Primary cortical neurons (12DIV) were transfected with YFP-actin or YFP-PSD-95 and RFP-Lifeactin with the phosphate calcium technique. Experiments were performed on 14 DIV cultures. Cultures were washed into phenol-lacking DMEM and imaged at room temperature. Images were acquired with Nikon EZ-C1 software at a resolution of 1024 x 1024 pixels. High magnification images were taken at a xyz resolution of 0.1 μm x 0.1 μm x 0.3 μm.

Atomic force microscopy

Solutions were characterized using a NanoScope III E-series piezoceramic scanner (Digital Instruments, USA). AFM probes were single-crystal silicon microcantilevers with 339-345 kHz resonant frequencies and 43-46 Newton/meter spring constant model (PPP-NCH, NanoAndMore, France). Sample was spotted on freshly cleaved mica, incubated at RT for 15 min, rinsed with 250 mM Ammonium acetate and blown dry with tetrafluoroethane. Image data were acquired at scan rates between 0.25 and 2 Hz.

Actin filaments visualization

10 μM non-muscle actin was prepared as previously indicated. FITC-phalloidin was added equimolar and polymerization was induced in polymerization buffer for 1 h in the presence/absence of $\text{A}\beta_0$ (5 μM). Resulting fluorescent filaments were diluted at 1/100th in Fluorescent Mounting medium (Dako France S.A.S). 4 μl were mounted and imaged on TE2000 Nikon Epifluorescence Microscope.

Analysis of YFP-actin labelled cortical neurons

Primary cortical neurons cultures (3 DIV) were transfected with YFP-actin with the calcium phosphate technique. Experiments were performed on 12-14 DIV cultures. 1024 x 1024 images were acquired with Nikon EZ-C1 software by using the same settings below saturation at a xy resolution of 0.1 μm x 0.1 μm . Sections of 0.3 μm were taken in Z-stack from top to bottom of the specimen before and after 1 hour of treatment and the brightest point projections were made. Image analysis was realized from three independent experiments.

Monitoring of actin polymerization/depolymerization using pyrene-labelled actin.

20% pyrene-labelled muscle actin was mixed with non-muscle dark actin at 2.8 μM prepared following the manufacturer's instructions: total depolymerization was obtained after 1 h at 4°C in a general actin buffer containing (in mM) 5 Tris-HCl pH 8.0, 0.2 CaCl_2 , 0.2 adenosine-triphosphate (ATP) and 0.5 dithiothreitol (DTT). Polymerization with or without $\text{A}\beta_0$ (5 μM) was induced in a buffer containing (in mM) 50 KCl, 2 MgCl_2 , 1 ATP and 0.5 DTT; and then monitored at 24°C by measuring the fluorescence signal of pyrene (exc.: 360 nm; em.: 407 nm) in a Chameleon spectrofluorimeter (HIDEX, ScienceTec, France). Depolymerization was induced by diluting pre-polymerized actin to 1/10th in a general actin buffer in the presence or absence of $\text{A}\beta_0$ (5 μM). Fluorescence measurements were performed every 30 s.

FRAP analysis

FRAP analysis was performed on spine head with the ZoomFRAP plugin of the EZ-C1 software (version 3.5). YFP-actin fluorescence signal was photobleached with 15 successive scans; images after photobleaching were taken every 2 s. For control, $\text{A}\beta_0$ (100 nM), $\text{A}\beta_f$ (100 nM) or jasplakinolide (1.25 μM) conditions, treatments were performed at RT for 15 min. For synaptic activation, cells were first treated or not before photobleaching with $\text{A}\beta_0$ for 15 min (100 nM),

then with bicuculline (BiC: 50 μ M) and 4-aminopyridine (4AP: 2.5 mM) for 5 min to activate excitatory synaptic neurotransmission.

Western Blot Analysis of SDS-PAGE

Electrophoresis was performed on 4–12% NuPAGE[®] Bis-Tris SDS-PAGE gels (Invitrogen). Western blot analysis was performed using anti-actin, anti-A β and anti-PSD95 primary antibodies with the corresponding secondary peroxidase-conjugated antibodies as described previously (1981).

Extraction of triton-sensitive and triton-resistant fraction after A β application

FITC-A β ₁₋₄₂ oligomers or fibrils (1 μ M) were applied on primary cortical neurons cultures for 15 min at 37°C or 4°C that were further gently washed with a cytoskeleton stabilization buffer containing 0.1 M MES (pH 6.75), 1 mM MgSO₄, 2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 4 M glycerol to remove the FITC-A β excess. For triton-sensitive fraction extraction, cells were incubated at 37 °C for 6 min in buffer containing 0.1 M MES (pH 6.75), 1 mM MgSO₄, 2 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 4 M glycerol supplemented with 0.1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail (1:100). The extract was then centrifuged at 37°C for 2 min at 10 000 g and the supernatant was saved. Extraction of the triton-resistant fraction was performed in lysis buffer containing 25 mM Tris (pH 6.8), 0.5% SDS supplemented with protease inhibitor cocktail. FITC fluorescence signal was then measured in both fractions on a Chameleon spectrofluorimeter.

Extraction of PSD/non-PSD fractions

Neuronal cultures were homogenized in 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.4. Homogenates were cleared at 1000 g for 10 min to remove nuclei and large debris. The resulting supernatant was concentrated at 12 000 g for 20 min to obtain a crude membrane fraction which was rinsed in 4 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH=7.4 for 20 min at 12 000 g. Then, the membrane fraction was incubated for 15 min at 4°C in 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5% triton X-100, pH= 7.2 and centrifuged at 12 000 g for 20 min to pellet the synaptosomal membrane fraction. The supernatant was considered as the non-PSD membrane fraction sometimes referred to as the triton-sensitive fraction. The pellet was solubilized in 20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1% triton X-100, 1% deoxycholic acid, 1% SDS, pH= 7.5 for 1 h at 4°C and centrifuged at 10 000 g for 15 min. The supernatant contained the PSD fraction also called triton-resistant fraction.

Phalloidin precipitation on purified actin and A β _o, neuronal cell lysates, brain tissues

Purified proteins: 2.8 μ M G-actin or F-actin was obtained after 1.5 h in either general actin buffer or polymerization buffer respectively and further incubated for 30 min with equimolar concentration of A β _o. ***Neuronal cell lysates:*** Cortical neurons cultures treated with either A β _o or A β _f (1 μ M) for 15 min at 37°C or 4°C were washed five times. Neurons were then lysed at 4 °C in homogenisation buffer (HB) (in mM) 100 Na₂HPO₄, 100 NaH₂PO₄ pH=7.2, 2 ATP, 2 MgCl₂ and protease/phosphatase inhibitor cocktails (1:100) by pipetting up and down using a syringe with a 25G needle. ***Brain tissues:*** 10 months-old wild-type or APPPS1-21 mice (with the mutations APP_{KM670/671NL}, PS1_{L166P} (2006b)) were anesthetized with isoflurane and a trans-cardiac perfusion with 0.9% NaCl solution containing heparin (5000 UI/ml) was performed. Brain was removed and cortices dissected. Brain tissues were lysed in HB with a potter homogenizer followed by pipetting up and down using a syringe with a 25G needle. Homogenates were cleared by a 1000 g centrifugation for 10 min, protein concentration was calculated using BCA assay and 300 μ g of proteins were used.

Each lysate or purified actin/A β _o was then incubated with biotin-phalloidin (1/100) at RT during 1 h. Streptavidin-Dynabeads[®] were incubated in phosphate-buffered solution with 5% bovine serum albumin at RT for 30 min. Beads and phalloidin-tagged actin were then incubated for 30 min at RT. After five consecutive washes, loading buffer containing β -mercaptoethanol was added to the samples, boiled 10 min at 95°C and the supernatant was analyzed by SDS-PAGE.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to examine differences in the area density of synapses between the 3xTg-AD and non-Tg animals, followed by post-hoc and *t*-test comparisons, when appropriate, at the different time points (implemented through GraphPad Prism 4.0, GraphPad Software, Inc.). Statistical significance in electrophysiology, FRAP experiments and normalized variance of fluorescence was assessed using one or two-factors ANOVA or ANOVA for repeated measures data followed by a post hoc analysis. * indicates significant from the corresponding control with a p value mentioned in the text unless p<0.0001 (*ns.* indicates p>0.05). N represents the number of independent experiments and *n* the number of regions of interest.

Acknowledgements

The transgenic mice APP/PS1-21 were obtained from Dr Jucker, Department of Cellular Neurology, Hertie-Institute for Clinical Brain Research, Tübingen, Germany.

Isabelle Monnet (AFM)

Karim Bordji (Provides the PSD-YFP plasmid)

Contributions:

This work was supported by the Fondation Neurodis, The program ANR Alzheimer MAALAD and the Fondation France Alzheimer.

Abbreviations

4-AP, 4-aminopyridine

A $\beta_{o/f}$, amyloid beta oligomers/fibrils

AD, Alzheimer's disease

AMPA, 2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid

AUC, area under curve

BiC, (-)-bicuculline methiodide

DIV, days *in vitro*

fEPSP, field excitatory post synaptic potentials

F/G-actin, filamentous-/globular- actin

HFS, high-frequency stimulation

LMW, low molecular weight

LTP, long-term potentiation

NMDA, N-methyl-D-aspartate

PPF, paired-pulse facilitation

PSD, postsynaptic density

RFP, red fluorescent protein

YFP, yellow fluorescent protein

References

- Bayer TA, Wirths O. Review on the APP/PS1KI mouse model: intraneuronal A β accumulation triggers axonopathy, neuron loss and working memory impairment. *Genes Brain Behav.* 2008; 7 Suppl 1: 6–11.
- Chen Y, Kramár EA, Chen LY, Babayan AH, Andres AL, Gall CM, et al. Impairment of synaptic plasticity by the stress mediator CRH involves selective destruction of thin dendritic spines via RhoA signaling. *Mol Psychiatry* 2012
- Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005; 8: 79–84.
- Durand CM, Perroy J, Loll F, Perrais D, Fagni L, Bourgeron T, et al. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 2012; 17: 71–84.
- Frost NA, Shroff H, Kong H, Betzig E, Blanpied TA. Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron* 2010; 67: 86–99.
- Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F. Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Research* 1991; 566: 77–88.
- Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 120: 885–890.
- Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100: 10417.
- Gu J, Lee CW, Fan Y, Komlos D, Tang X, Sun C, et al. ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nature Neurosci.* 2010; 13: 1208–1215.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184–185.

Harris KM, Kater SB. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* 1994; 17: 341–371.

Harris KM, Stevens JK. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* 1989; 9: 2982–2997.

Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, et al. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 2009; 185: 323–339.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1981; 29: 577.

Hu X, Crick SL, Bu G, Frieden C, Pappu RV, Lee JM. Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106: 20324–20329.

Kamiya H, Zucker RS. Residual Ca²⁺ and short-term synaptic plasticity. *Nature* 1994; 371: 603–606.

Kim CH, Lisman JE. A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *Journal of Neuroscience* 1999; 19: 4314–4324.

Korobova F, Svitkina T. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 2010; 21: 165–176.

Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95: 6448–6453.

Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta

protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006; 440: 352–357.

Lesné S, Kotilinek L. Amyloid plaques and amyloid-beta oligomers: an ongoing debate. *Journal of Neuroscience* 2005; 25: 9319–9320.

Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid β protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* 2009; 62: 788–801.

Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, et al. Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American journal of pathology* 1999; 155: 853.

McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1999; 46: 860–866.

Minamide LS, Striegl AM, Boyle JA, Meberg PJ, Bamburg JR. Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 628–636.

Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *Journal of Neuroscience* 2000; 20: 4050–4058.

Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat. Med.* 2001; 7: 59–64.

Okamoto K-I, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1104–1112.

Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nature* 2010; 465: 812–818.

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 2006; 7: 940–946.

Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, et al. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Meth* 2008; 5: 605–607.

Rowan MJ, Klyubin I, Wang Q, Hu NW, Anwyl R. Synaptic memory mechanisms: Alzheimer's disease amyloid beta-peptide-induced dysfunction. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35: 1219–1223.

Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 2005; 8: 1051–1058.

Sorra KE, Harris KM. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus* 2000; 10: 501–511.

Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 2002; 5: 239–246.

Stine WB, Dahlgren KN, Krafft GA, LaDu MJ. In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 11612–11622.

Viola KL, Velasco PT, Klein WL. Why Alzheimer's is a disease of memory: the attack on synapses by A beta oligomers (ADDLs). *J Nutr Health Aging* 2008; 12: 51S–7S.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; 416: 535–539.

Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB. Amyloid β -protein fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 22364–22372.

3. Conclusion

Depuis plusieurs années, la recherche sur la maladie d'Alzheimer s'est concentrée sur l'impact des différentes conformations de l'A β responsable du déclin cognitif caractéristique de cette pathologie (Lambert *et al.*, 1998). Plusieurs études démontrent que les oligomères d'A β sont responsables de ce déficit de mémoire. En effet, il existe une corrélation entre l'apparition du déclin cognitif et la perte synaptique avec la présence d'A β dans les cerveaux de patients atteints de MA (Lue *et al.*, 1999 ; McLean *et al.*, 1999). La perte importante des épines est observée aussi bien dans les cerveaux de patients atteints de MA que dans les modèles transgéniques de MA ainsi que des suites d'une exposition aux A β .

Ces résultats présentent une perturbation synaptique très précoce et importante qui précède la perte complète des épines ou leur rétractation suite à une exposition aux A β . Cette perte synaptique découle de l'altération de l'actine, qui possède une place majeure dans la synapse et sa plasticité. La réorganisation du cytosquelette d'actine est l'un des événements majeurs lors de la consolidation de l'épine suite à une stimulation synaptique. Or, cette dynamique est affectée par l'A β , qui pénètre de manière active dans le compartiment synaptique et interagit directement avec l'actine filamenteuse.

La réorganisation de l'actine filamenteuse dans la post-synapse est responsable de la distribution à la membrane des récepteurs AMPA. Ici, ni le compartiment pré-synaptique ni les courants des R-AMPA ne sont affectés par l'exposition aux A β . Cependant, la LTP est altérée (Shankar *et al.*, 2007 ; Walsh *et al.*, 2002) illustrant l'impact post-synaptique des A β .

Dans ces travaux, nous illustrons un effet post-synaptique par pénétration de l'A β qui va s'accumuler au niveau des épines dendritiques, et particulièrement à la densité post synaptique, qui conduit à une réorganisation du cytosquelette d'actine altérant sa stabilité et sa fonction. Ainsi, le recrutement actine-dépendant des récepteurs AMPA à la synapse durant ce processus ne peut plus s'effectuer.

L'étude de l'effet d'agent pharmacologique déstabilisant l'actine filamenteuse comme la latrunculine, qui accapare les monomères d'actine, ou d'agent stabilisateur de l'actine-F comme la jasplakinolide, apportent des indices quant au mécanisme d'action de l'A β . Les effets des oligomères d'A β ressemblent à ceux exercés par la jasplakinolide, qui empêche la dépolymérisation, suggérant que l'A β joue un rôle stabilisateur de l'actine-F. L'étude en

système purifié de l'interaction entre l'A β o et l'actine-F révèle que la polymérisation de l'actine n'est pas affectée par la présence d'A β mais la dépolymérisation est ralentie. Les études en fluorescence à l'aide de la technique de FRAP confirment cet effet stabilisateur de l'A β o sur le cytosquelette d'actine. Ces résultats apportent donc des éléments de réponses sur les mécanismes d'altération du cytosquelette par l'A β o.

En conclusion, ces travaux montrent que le cytosquelette d'actine, élément essentiel dans la plasticité synaptique, est affecté dans la MA de manière directe. Cette interaction avec l'A β o perturbe la dynamique du cytosquelette d'actine ce qui altère la capacité de la synapse à répondre aux stimuli synaptiques. Ces données apportent donc des éléments de réponse concernant les mécanismes qui altèrent le fonctionnement synaptique et ainsi perturbent les processus à la base de la mémoire.

Discussion générale

La maladie d'Alzheimer est une pathologie caractérisée par un déclin cognitif progressif. Ce déclin inclut des altérations de la mémoire. Au niveau cellulaire, cette altération de la mémoire peut être corrélée à une perte progressive des synapses et *in fine* des neurones. L'altération des synapses est donc un événement précoce de la maladie d'Alzheimer et c'est ce compartiment qui est en premier lieu exposé à des altérations fonctionnelles. C'est pour cela qu'il est aujourd'hui important de connaître les mécanismes délétères qui conduisent à ces dysfonctionnements.

Mes travaux de thèse ont eu pour but de mettre en lumière ces mécanismes néfastes et mieux comprendre leurs origines. La compréhension de l'implication de la protéine tau au niveau de la physiologie de la synapse est importante, car celle-ci est en partie à l'origine de la synaptotoxicité A β -dépendante (Roberson *et al.*, 2007). Peu d'études ont été portées sur la fonction physiologique synaptique de tau, il est donc capital de connaître ses fonctions biologiques de base afin de définir les différentes altérations que l'on retrouve au niveau synaptique.

Tau et les récepteurs NMDA

Nous avons montré que le recrutement synaptique de tau est dépendant de l'activité neuronale. Plusieurs études montrent que le rôle de tau est d'apporter la kinase fyn à la synapse (Ittner *et al.*, 2010) où elle est nécessaire à l'établissement de l'efficacité et à la mise en place de la plasticité synaptique, essentiels dans les processus de LTP (Grant *et al.*, 1992). En effet, la phosphorylation des R-NMDA par fyn potentialise les courants NMDA et stabilise ces récepteurs à la synapse (Trepanier *et al.*, 2012). Ces récepteurs étant essentiels dans les processus de plasticité, fyn occupe une place importante dans la régulation de la plasticité synaptique impliquant ainsi la protéine tau par son rôle de transporteur de fyn.

Ce rôle de tau dans le compartiment synaptique semble être dépendant de son état de phosphorylation. Mondragon-Rodriguez et collaborateurs ont mis en évidence que cet état de phosphorylation peut être régulé par l'activation des récepteurs NMDA. En retour les courants NMDA sont augmentés par l'expression d'une forme hyperphosphorylée de tau (tauE phosphorylée en 14 épitopes, Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). Ces observations peuvent être mises en parallèle avec l'étude de Peineau et collaborateurs montrant que la GSK3 β , l'une des kinase principale de tau en terme de résidus ciblés, est activée durant ce processus de LTD

(Peineau *et al.*, 2007). Il semble donc que tau régule la fonction des R-NMDA et inversement. En effet, si l'on résume les travaux effectués par Mondragon Rodriguez et collaborateurs, agir sur les récepteurs NMDA induit des variations de l'état de phosphorylation de tau synaptique et inversement la surexpression de formes mutées de tau induit des variations de courant NMDA (Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). Ces éléments indiquent que l'état de phosphorylation de tau joue un rôle important dans ces mécanismes, probablement en affectant l'interaction tau-fyn.

L'affinité de tau pour fyn varie selon l'isoforme et selon l'état de phosphorylation (Bhaskar, 2005). Nous avons montré que la tau recrutée à la synapse est phosphorylée au niveau du site Thr-205 lors d'une activation synaptique. Ces résultats sont concomitants avec une augmentation de fyn à la synapse. On peut donc supposer que dans le contexte physiologique d'une activation synaptique, le complexe tau-fyn participe au renforcement de la fonction R-NMDA permettant ainsi d'instaurer une réponse plus efficace durant les phénomènes de LTP.

On peut donc suggérer qu'une des fonctions synaptiques de tau est de réguler la fonction des R-NMDA et pourrait être impliquée dans les mécanismes synaptotoxiques retrouvés dans la MA.

Rôle synaptotoxique de tau

L'étude de tau dans un contexte pathologique comme celui de la MA, plus spécifiquement en s'intéressant au pan amyloïde de la pathologie permet d'apporter quelques éléments à l'hypothèse du rôle synaptique de tau.

Des études récentes ont montré le lien entre tau et la toxicité d'A β o par l'utilisation de modèles transgéniques de MA dans lesquels l'extinction de tau prévient des déficits cognitifs (Ittner *et al.*, 2010; Roberson *et al.*, 2007). Nous avons démontré que l'exposition des neurones à l'A β o induit une translocation de tau à la synapse, ainsi qu'une variation de son état de phosphorylation.

Un grand nombre de sites de phosphorylations existent sur tau, nous avons choisi d'en étudier deux en particulier, la Thr-205 et la Ser-404. Ainsi, en présence d'A β o on observe une diminution de la Thr-205 au profit de la Ser-404. Les phosphorylations de tau en condition physiologique sont donc différentes de celles sous condition A β o, puisqu'à l'inverse, la Thr-205 est plus phosphorylée lors d'une activation synaptique. De plus, nous observons une accumulation de fyn au niveau synaptique sous l'effet de l'A β o. Cette augmentation de fyn est

probablement liée au recrutement de tau dans la synapse. En accord avec la littérature, on peut donc suggérer que le rapatriement synaptique de tau sous l'effet de l'A β pourrait être lié à son état de phosphorylation (Hoover *et al.*, 2010 ; Zempel *et al.*, 2013). Ce recrutement anormal du complexe tau/fyn pourrait être à l'origine d'une altération de la signalisation NMDA par exemple et expliquer l'effet synaptotoxique dépendant de tau.

Un autre partenaire de tau : l'actine

Le cytosquelette d'actine est l'un des partenaires de tau. Cette interaction a été montrée dans des modèles de protéines purifiées, dans des modèles cellulaires et chez la drosophile (He *et al.*, 2009 ; Yu, 2006 ; Fulga *et al.*, 2006). Ici, nous avons mis en évidence une interaction entre l'actine filamenteuse synaptique et tau. Cette interaction semble importante pour l'adressage de tau à la synapse. Ainsi durant une activation synaptique, le cytosquelette synaptique d'actine se réorganise et se complexifie. Par la technique de précipitation à la phalloïdine, nous avons démontré que la quantité de protéine tau synaptique est proportionnelle à la quantité d'actine filamenteuse. Les expériences menées en système purifié révèlent que tau possède la capacité d'interagir non seulement avec l'actine filamenteuse, mais peut aussi l'organiser en groupements (bundle) illustrant ainsi que tau participe à la création d'un assemblage stable des filaments d'actine dans la synapse.

Sur des cultures de neurones, nos résultats indiquent que la dynamique de tau pourrait être reliée à celle de l'actine. En effet, l'utilisation de la jasplakinolide induit une forte augmentation de tau à la synapse indiquant que la conversion de l'actine-G en actine-F induit la translocation et l'accumulation de tau dans le compartiment synaptique. Ces résultats suggèrent que tau est un partenaire naturel de l'actine-F, au même titre que les microtubules, et que son augmentation à la synapse est dépendante de la dynamique de l'actine. On peut donc proposer un rôle de tau comme stabilisateur du cytosquelette d'actine, par similitude avec les microtubules. Ces suggestions soulèvent donc la question des conditions qui régissent l'interaction de tau soit avec les microtubules soit avec le cytosquelette d'actine. L'étude des phosphorylations de tau et de leurs rôles sur l'affinité de tau pour ses partenaires pourrait être un élément de réponse. L'affinité pour les microtubules ainsi que pour fyn dépend de l'état de phosphorylation de tau. On pourrait donc imaginer que la combinaison des phosphorylations de tau détermine à la fois ses partenaires et ses fonctions.

Dans les conditions pathologiques, cette interaction avec l'actine est peut être un élément clé dans la compréhension des mécanismes délétères qui surviennent dans la synapse.

L'application d'A β affecte le cytosquelette d'actine en agissant sur ses partenaires, mais aussi en interagissant directement avec l'actine. Nos résultats montrent une interaction directe stabilisatrice des filaments d'actine par l'A β , cette action stabilisatrice pouvant alors participer à l'augmentation du recrutement de tau en dehors d'une activation synaptique. L'effet de l'augmentation de tau et l'interaction d'A β avec les filaments pourraient impacter fortement la dynamique de l'actine. Ces éléments pourraient expliquer l'absence de réponse synaptique en présence d'A β . L'actine ne serait plus apte à se réorganiser et à effectuer son rôle synaptique impliquant une altération de la plasticité synaptique.

L'étude de la dynamique de tau et de l'actine sous conditions d'activation synaptique et en présence d'A β apporte des éléments de réponse. En présence d'A β , les expériences de FRAP révèlent que tau est beaucoup plus dynamique que sous activation synaptique. En effet, lors d'une activation synaptique, le cytosquelette d'actine se renforce et se stabilise, tau est recruté à la synapse où elle interagit avec différents partenaires qui la stabilise dans la PSD. Sous l'influence de A β , on observe également que l'actine est aussi plus stable alors que tau présente une dynamique synaptique augmentée. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les oligomères d'A β induisent une polymérisation du cytosquelette d'actine de façon indépendante de l'activité synaptique. Cette stabilisation de l'actine proviendrait à la fois de l'interaction actine/A β et actine/tau. Ce phénomène créerait un cercle vicieux permettant à une plus grande quantité de tau d'être recruté à la synapse de façon non contrôlée et expliquer l'augmentation de la dynamique de tau dans ce compartiment. Ces données pourraient expliquer le rôle synaptotoxique de tau à la synapse en présence d'A β .

En conclusion, l'ensemble de ces travaux démontre l'existence d'une fonction physiologique synaptique de la protéine tau. Les mécanismes sous-jacents à sa fonction synaptique restent à élucider, mais il semblerait que l'état de phosphorylation de tau puisse avoir un rôle à jouer dans ces processus. De plus, ces travaux mettent en évidence l'effet synaptotoxique direct des oligomères d'A β par la perturbation de la fonction synaptique de tau et du cytosquelette d'actine. Ces données viennent donc enrichir les connaissances sur les processus synaptotoxiques survenant dans la MA et apportent ainsi des indices sur les événements précoces de cette pathologie.

Bibliographie

A

Allison, D., Gelf, V., and Spector, I. (1998). Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *The Journal of Neuroscience*, 18(7):2423–2436

Almeida, C.G. (2006). beta-Amyloid Accumulation Impairs Multivesicular Body Sorting by Inhibiting the Ubiquitin-Proteasome System. *Journal Of Neuroscience* 26, 4277-4288.

Alzheimer, A., 1907. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*.

Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease* 1739, 91-103.

Anggono, V., and Huganir, R.L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current Opinion In Neurobiology* 22, 461-469.

Arnold, C., Johnson, G., Cole, R., and Dong, D. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *Journal Of Biological Chemistry* 271:28741-28744

Atri A., Molinuevo J.L., Lemming O., Wirth Y., Pulteand I. and Wilkinson D. (2013) Memantine in patients with Alzheimers disease receiving donepezil: new analyses of efficacy and safety for combination therapy. *Alzheimer's Research & Therapy* 5:6

B

Bading, H., and Greenberg, M. (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science*.253: 912-914

Bajaj, G., Zhang, Y., Schimerlik, M.I., Hau, A.M., Yang, J., Filtz, T.M., Kioussi, C., and Ishmael, J.E. (2008). N-Methyl-D-aspartate Receptor Subunits Are Non-myosin Targets of Myosin Regulatory Light Chain. *Journal Of Biological Chemistry* 284, 1252-1266.

Balietti, M., Giorgetti, B., Casoli, T., Solazzi, M., Tamagnini, F., Burattini, C., Aicardi, G., and Fattoretti, P. (2013). Early selective vulnerability of synapses and synaptic mitochondria in the hippocampal CA1 region of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Journal Of Alzheimer's Disease : JAD* 34, 887-96.

Barnes, D.D.E., Barnes, D.E., MD, P.K.Y., and Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *The Lancet Neurology* 10, 819-828.

Benoist, M., Rocí, Roc, iacute, Palenzuela, O., Rozas, C., Rojas, P., Tortosa, E., Morales, B., Gonz, C., et al. (2013). MAP1B-dependent Rac activation is required for AMPA receptor endocytosis during long-term depression. *The EMBO Journal* 32, 2287-2299.

Bhaskar, K. (2005). Disease-related Modifications in Tau Affect the Interaction between Fyn and Tau. *Journal Of Biological Chemistry* 280, 35119-35125.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E.M. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153-63.

Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., and LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675-88.

Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal Of Physiology* 232, 331-56.

Boekhoorn, K. (2006). Improved Long-Term Potentiation and Memory in Young Tau-P301L Transgenic Mice before Onset of Hyperphosphorylation and Tauopathy. *Journal Of Neuroscience* 26, 3514-3523.

Brandt, R., Léger, J., and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *The Journal Of Cell Biology*. 131 (5) 1327-1340

Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*. 82:239 - 259

Bramham, C.R. (2008). Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Current Opinion In Neurobiology* 18, 524-531.

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

Buée, L., Bussiere, T., and Buée-Scherrer, V. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Research. Reviews* 33: 95–130

C

Carlin, R., Grab, D., and Cohen, R. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *The Journal Of Cell*. 86: 831-843

Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., and Sosunov, A. (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J*. 2041-2041

Chen, Q., Zhou, Z., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Y., Zhong, M., Xu, S., Chen, C., Li, L., and Yu, Z. (2012). Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF. *Neurochemistry International* 60, 233-242.

Cheng, D., Hoogenraad, C., Rush, J., and Ramm, E. (2006). Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Molecular & Cellular Proteomics* 5.6:1158-1170

Chew, Y.L., Fan, X., Gotz, J., and Nicholas, H.R. (2013). PTL-1 regulates neuronal integrity and lifespan in *C. elegans*. *Journal Of Cell Science* 126, 2079-2091.

Chivet, M., Javalet, C., Hemming, F., Pernet-Gallay, K., Laulagnier, K., Fraboulet, S., and Sadoul, R. (2013). Exosomes as a novel way of interneuronal communication. *Biochemical Society Transactions* 41, 241-244.

- Cingolani, L.A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 344-356.
- Colledge, M., Snyder, E., Crozier, R., and Soderling, J. (2003). Ubiquitination regulates PSD-95 degradation and AMPA receptor surface expression. *Neuron*. 40:595–607
- Collingridge, G., and Kehl, S. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.*334: 33-46
- Corder, E., Saunders, A., Risch, N., and Strittmatter, W. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics*. 7:180-184
- Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I.S., Liem, R.K., Shelanski, M.L., and Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89, 4378-81.
- Crimins, J.L., Pooler, A., Polydoro, M., Luebke, J.I., and Spires-Jones, T.L. (2013). The intersection of amyloid beta and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews* 12, 757-763.
- Cripps, D. (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.
- Cull-Candy, S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment* 2004, re16.
- Cummings, J. (2008). The black book of Alzheimer's disease, part 1. Primary Psychiatry.

D

- D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., Zio, D.D., Carrara, P., Battistini, L., et al. (2010). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience* 14, 69-76.
- Dawson, H., Ferreira, A., and Eyster, M. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from τ deficient mice. *Journal Of Cell Biol.* 114 (6):1179-1187
- de Calignon, A., Polydoro, M., Suárez-Calvet, M., William, C., Adamowicz, D., Kopeikina, K., Pitstick, R., Sahara, N., Ashe, K., Carlson, G., et al. (2012). Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease. *Neuron* 73, 685-697.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2004). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. 1-10.
- Delacourte, A., and Defossez, 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, 173-86.
- Delint-Ramírez, I., Salcedo-Tello, P., and Bermudez-Rattoni, F. (2008). Spatial memory formation induces recruitment of NMDA receptor and PSD-95 to synaptic lipid rafts. *Journal Of Neurochemistry* 106, 1658-68.
- Dinamarca, M., Ríos, J., and Inestrosa, N. (2012). Postsynaptic receptors for amyloid- β oligomers as mediators of neuronal damage in Alzheimer's disease. *Frontiers In Physiology*.3:1-7
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*.51:7-61

Dolan, P.J., and Johnson, G.V. (2010). The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Current Opinion In Drug Discovery & Development* 13, 595-603.

Dorval, V. (2006). Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Modification of Natively Unfolded Proteins Tau and α -Synuclein. *Journal Of Biological Chemistry* 281, 9919-9924.

Douglas, R.M., and Goddard, G.V. (1975). Long-term potentiation of the perforant path-granule cell synapse in the rat hippocampus. *Brain Research* 86, 205-15.

E

Ehlers, M.D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience* 6, 231-42.

Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., and Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 104, 4176-4181.

Eckermann, Eckermann, K., Mocanu, M.-, Khlistunova, I., Biernat, J., Nissen, A., Hofmann, A., Schonig, K., Bujard, H., Haemisch, A., et al. (2007). The beta-Propensity of Tau Determines Aggregation and Synaptic Loss in Inducible Mouse Models of Tauopathy. *Journal Of Biological Chemistry* 282, 31755-31765.

El-Husseini, A.E., and Brecht, D.S. (2002). Protein palmitoylation: a regulator of neuronal development and function. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 791-802.

Ethell, I.M., and Pasquale, E.B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress In Neurobiology* 75, 161-205.

F

Feuillette, S., Miguel, L., and Frébourg, T. (2010). Drosophila models of human tauopathies indicate that Tau protein toxicity in vivo is mediated by soluble cytosolic phosphorylated forms of the protein. *Journal Of Neurochemistry* 113 :895–903

Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., and Brinkhaus, H. (2000). Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature*.3:887-894

Flunkert, S., Hierzer, M., Löffler, T., and Rabl, R. (2012). Elevated Levels of Soluble Total and Hyperphosphorylated Tau Result in Early Behavioral Deficits and Distinct Changes in Brain Pathology in a New Tau Transgenic Neurodegenerative. 11:194205

Fujio, K., Sato, M., Uemura, T., Sato, T., Sato-Harada, R., and Harada, A. (2007). 14-3-3 proteins and protein phosphatases are not reduced in tau-deficient mice. *Neuroreport* 18, 1049-52.

Fulga, T., Elson-Schwab, I., Khurana, V., and Steinhilb, M. (2006). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nature Cell*.9:139-148

G

Genin, E., Hannequin, D., Wallon, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Bullido, M.J., Engelborghs, S., de Deyn, P.D., Berr, C., et al. (2011). APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Molecular Psychiatry* 16, 903-907.

Goedert, M. (2009). Oskar Fischer and the study of dementia. *Brain*. 132; 1102-1111

Goedert, M., and 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, 4225-30.

Goedert, M., Spillantini, M., Jakes, R., and Rutherford, D. (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., Wischik, C., and Crowther, R. (1988). Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau PNAS 85:4051-4055

Götz, J., Xia, Leinenga, G., Chew, Y.L., and Nicholas, H. (2013). What Renders TAU Toxic. *Frontiers In Neurology* 4.1:10

Graeber, Alois Alzheimer (1864-1915)

Grant, S., O'dell, T., Karl, K., Stein, P., and Soriano, P. (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science*.258:1903-1910

Griffith, L., and Pollard, T. (1982). The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *Journal Of Biological Chemistry*.257:9143-9151

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and George, L. (1989). Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. PNAS 86:2853-2857

Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Tung, Y. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. PNAS 83:4913-4917

Gyure, K., Durham, R., and Stewart, W. (2001). Intraneuronal A β -amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Of Pathology Amp*.125:489-492

H

Haass, C., and Selkoe, D. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.8:101-121

Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., and Lannfelt, L. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medecine* 1, 11291-1296.

Halpain, S. (2000). Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends In Neurosciences*. 23, 141-146

Hanger, D.P., Byers, H.L., Wray, S., Leung, K.-., Saxton, M.J., Seereeram, A., Reynolds, C.H., Ward, M.A., and Anderton, B.H. (2007). Novel Phosphorylation Sites in Tau from Alzheimer Brain Support a Role for Casein Kinase 1 in Disease Pathogenesis. *Journal Of Biological Chemistry* 282, 23645-23654.

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

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

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., and Terada, S. (1994b). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*.369:488-491

Hardingham G.E., Fukunaga Y. and Bading H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nature Neuroscience*. 5:405-414

Hardingham G.E., and Bading H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neuroscience* 11(10): 682–696

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (New York, N.Y.) 256, 184-5.

Harney, S.C., Jane, D.E., and Anwyl, R. (2008). Extrasynaptic NR2D-Containing NMDARs Are Recruited to the Synapse during LTP of NMDAR-EPSCs. *Journal Of Neuroscience* 28, 11685-11694.

He, H., Wang, X., Pan, R., Wang, D., Liu, M., and He, R. (2009). The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biology*.10:81

Hering, H., and Sheng, M. (2003). Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *The Journal Of Neuroscience*.23:11759-11769

Hernandez, P., Lee, G., and Sjoberg, M. (2009). Tau Phosphorylation by cdk5 and Fyn in Response to Amyloid Peptide A β _{25-35}: Involvement of Lipid Rafts. *Journal Of Alzheimer's*.16:149-156

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

Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., and Rogers, S. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*. 342:643-648

Hoover, B.R., Mir, Reed, A.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., et al. (2010). Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067-1081.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron* 52, 831-843.

Hu, X., Crick, S.L., Bu, G., Frieden, C., Pappu, R.V., and Lee, J.-. (2009). Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid-beta peptide. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 106, 20324-20329.

I

Ittner, L.M., and Götz, J. (2010). Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* 12, 65-72.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell* 142, 387-397.

Ivanov, A., Esclapez, M., Pellegrino, C., Shirao, T., and Ferhat, L. (2009). Drebrin A regulates dendritic spine plasticity and synaptic function in mature cultured hippocampal neurons. *Journal Of Cell Science* 122, 524-534.

J

Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortl, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P.D., Demmers, J., et al. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron* 61, 85-100.

Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96-99.

K

- Kandel, E.R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Bioscience Reports* 21, 565-611.
- Kennedy, M.J., Davison, I.G., Robinson, C.G., and Ehlers, M.D. (2010). Syntaxin-4 Defines a Domain for Activity-Dependent Exocytosis in Dendritic Spines. *Cell* 141, 524-535.
- Kerr, J.M., and Blanpied, T.A. (2012). Subsynaptic AMPA Receptor Distribution Is Acutely Regulated by Actin-Driven Reorganization of the Postsynaptic Density. *Journal Of Neuroscience* 32, 658-673.
- Kervern, M., Angeli, A., Nicole, O., and Léveillé, F. (2012). Selective Impairment of Some Forms of Synaptic Plasticity by Oligomeric Amyloid- β Peptide in the Mouse Hippocampus: Implication of Extrasynaptic NMDA Receptors. *Journal Of Alzheimer's disease*.32:183-196
- Kessels, H.W., and Malinow, R. (2009). Synaptic AMPA Receptor Plasticity and Behavior. *Neuron* 61, 340-350.
- Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192-3.
- Kidd, M. (1964). ALZHEIMER'S DISEASE--AN ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY. *Brain : A Journal Of Neurology* 87, 307-20.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 5, 771-781.
- Kim, M.J., Futai, K., Jo, J., Hayashi, Y., Cho, K., and Sheng, M. (2007). Synaptic Accumulation of PSD-95 and Synaptic Function Regulated by Phosphorylation of Serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56, 488-502.
- Klein, C., Krämer, E., and Cardine, A. (2002). Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *The Journal Of Neuroscience* 22:698-707
- Kneussel, M., and Wagner, W. (2013). Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. *Nature Reviews Neuroscience* 14, 233-247.
- Kojima, N., Wang, J., and Mansuy, I. (1997). Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. *PNAS* 94: 4761–4765.
- Kojima, N., Hanamura, K., Yamazaki, H., Ikeda, T., Itohara, S., and Shirao, T. (2010). Genetic disruption of the alternative splicing of drebrin gene impairs context-dependent fear learning in adulthood. *Neuroscience* 165, 138-150.
- Kopec, C.D. (2006). Glutamate Receptor Exocytosis and Spine Enlargement during Chemically Induced Long-Term Potentiation. *Journal Of Neuroscience* 26, 2000-2009.
- Kopeikina, K.J., Kopeikina, K.J., Carlson, G.A., Pitstick, R., Ludvigson, A.E., Peters, A., Luebke, J.I., Koffie, R.M., Frosch, M.P., Hyman, B.T., et al. (2011). Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer's Disease Brain. *The American Journal Of Pathology* 179, 2071-2082.
- Kopeikina K.J. , Hyman B., Spires-Jones T.L. (2012). Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. *Translational Neuroscience* 3, 223-233.

Kopeikina K.J., Polydoro M., Tai H.C., Yaeger E., Carlson G. A., Pitstick R., Hyman B., Spires-Jones T.L. (2013). Synaptic alterations in the rTg4510 mouse model of tauopathy. *Journal Of Comparative Neurology* 521, 1334-1353.

Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science (New York, N.Y.)* 269, 1737-40.

Kourrich, S., Glasgow, S.D., Caruana, D.A., and Chapman, C.A. (2008). Postsynaptic Signals Mediating Induction of Long-Term Synaptic Depression in the Entorhinal Cortex. *Neural Plasticity* 2008, 1-9.

Kremer, A., Maurin, H., Demedts, D., Devijver, H., Borghgraef, P., and Leuven, F. (2011). Early Improved and Late Defective Cognition Is Reflected by Dendritic Spines in Tau.P301L Mice. *Journal Of Neuroscience* 31, 18036-18047.

Kuriu, T. (2006). Differential Control of Postsynaptic Density Scaffolds via Actin-Dependent and -Independent Mechanisms. *Journal Of Neuroscience* 26, 7693-7706.

L

Landis, and Reese, T. (1983). Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *The Journal Of Cell Biology*.97:1169-1178

LaFerla, F., Green, K., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*.8:499-509

Lacor, P.N. (2004). Synaptic Targeting by Alzheimer's-Related Amyloid Oligomers. *Journal Of Neuroscience* 24, 10191-10200.

Lambert, M., Barlow, A., and Chromy, B. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *PNAS* 95:6448-6453

Lebouvier, T., Scales, T., and Williamson, R. (2009). The microtubule-associated protein tau is also phosphorylated on tyrosine. *Journal Of Alzheimer's*.18:1-9

Ledesma, M., Bonay, P., Colaco, C., and Avila, J. (1994). Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *Journal Of Biological Chemistry*.269:21614-619.

Lee, G., and Leugers, C. (2012). Tau and tauopathies. In *Molecular Biology And Translational Science*. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012 ; 107: 263-293

Lee, G. (2004). Phosphorylation of Tau by Fyn: Implications for Alzheimer's Disease. *Journal Of Neuroscience* 24, 2304-2312.

Lee, G., Newman, S., Gard, D., and Band, H. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *Journal Of Cell.Science* 111:3167-3177

Lee, S., Kim, W., Li, Z., and Hall, G.F. (2012). Accumulation of Vesicle-Associated Human Tau in Distal Dendrites Drives Degeneration and Tau Secretion in an In Situ Cellular Tauopathy Model. *International Journal Of Alzheimer's Disease* 2012, 1-16.

Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D.I., Spoorri, L., Ciccotosto, G.D., Wright, D.K., Wong, B.X.W., Adlard, P.A., Cherny, R.A., Lam, L.Q., et al. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nature Medicine* 18, 291-295.

- Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., and Selkoe, D. (2009). Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron* 62, 788-801.
- Li S., Jin M., Koeglsperger T., Shepardson N.E., Shankar G.M., Selkoe D.J., (2011). Soluble A Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors. *Journal Of Neuroscience* 31, 6627-6638.
- Ling, D.S., Benardo, L.S., Serrano, P.A., Blace, N., Kelly, M.T., Crary, J.F., and Sacktor, T.C. (2002). Protein kinase M ζ is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nature Neuroscience* 5, 295-296.
- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews. Neuroscience* 3, 175-90.
- Lisman, J., Yasuda, R., and Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*.13:169-182
- Litersky, J., Johnson, G., Jakes, R., Goedert, M., and Lee, M. (1996). Tau protein is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II within its microtubule-binding domains at *Biochem J*.318-655-660
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *European Journal Of Neuroscience* 22, 1942-1950.
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J., Witter, M., and Small, S. (2012). Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *Plos ONE*.7:31302
- Liu, L. (2004). Role of NMDA Receptor Subtypes in Governing the Direction of Hippocampal Synaptic Plasticity. *Science* 304, 1021-1024.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S.C., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 92, 10369-73.
- Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., and Barrionuevo, G. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *305:719-721*
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiological Reviews* 84, 87-136.

M

- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., and Steimer, T. (1999). Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *The EMBO*.18:3007-3012
- Mairet-Coello, G., Courchet, J., Pieraut, S., Courchet, V., Maximov, A., and Polleux, F. (2013). The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of A β Oligomers through Tau Phosphorylation. *Neuron* 78, 94-108.
- Makino, H., and Malinow, R. (2009). AMPA Receptor Incorporation into Synapses during LTP: The Role of Lateral Movement and Exocytosis. *Neuron* 64, 381-390.
- Malenka, R., Kauer, J., Perkel, D., and Nicoll, R. (1989). The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission—its role in long-term potentiation. *Trends In Neurosciences*.12:444-450

Man, H., Wang, Q., Lu, W., Ju, W., Ahmadian, G., and Liu, L. (2003). Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 38, 611–624

Matus, A. (2000). Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290:754-758

Mauna, J.C., Miyamae, T., Pulli, B., and Thiels, E. (2011). Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus* 21, 1093-1104.

McDermott, J., Aamodt, S., and Aamodt, E. (1996). *ptl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene whose products are homologous to the τ microtubule-associated proteins. *Biochemistry* 35, 9415-9423

Menna, E., Disanza, A., Cagnoli, C., Schenk, U., Gelsomino, G., Frittoli, E., Hertzog, M., Offenhauser, N., Sawallisch, C., Kreienkamp, H., et al. (2009). Eps8 Regulates Axonal Filopodia in Hippocampal Neurons in Response to Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *Plos Biology* 7, e1000138.

Merino-Serrais, P., Benavides-Piccione, R., Blazquez-Llorca, L., Kastanauskaite, A., Rabano, A., Avila, J., and DeFelipe, J. (2013). The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 136, 1913-1928.

Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., and Webster, L. (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396, 433:439

Min, S., Cho, S., Zhou, Y., Schroeder, S., Haroutunian, V., Seeley, W.W., Huang, E.J., Shen, Y., Masliah, E., Ch, et al. (2010). Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to Tauopathy. *Neuron* 68, 801.

Mondragon-Rodriguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., and Boehm, J. (2012). Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Tau Phosphorylation. *Journal Of Biological Chemistry* 287, 32040-32053.

Morris, M., Hamto, P., Adame, A., Devidze, N., Masliah, E., and Mucke, L. (2013). Age-appropriate cognition and subtle dopamine-independent motor deficits in aged Tau knockout mice. *Neurobiology Of Aging* 34, 1523-1529.

Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319, 774-6.

Müller, R., Heinrich, M., Heck, S., Blohm, D., and Richter-Landsberg, C. (1997). Expression of microtubule-associated proteins MAP2 and tau in cultured rat brain oligodendrocytes. *Cell And Tissue Research* 288, 239-49.

N

Nag, S., Ma, Q., Wang, H., Chumnarnsilpa, S., Lee, W.L., Larsson, M., Kannan, B., Hernandez-Valladares, M., Burtnick, L.D., and Robinson, R.C. (2009). Ca²⁺ binding by domain 2 plays a critical role in the activation and stabilization of gelsolin. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 106, 13713-13718.

Nägerl V., Eberhorn N., Cambridge S.B., Bonhoeffer T. (2004) Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in Hippocampal Neurons. *Neuron* 44:759-767

Neil, and Kline, A. (2012). Apolipoprotein E, amyloid- β clearance and therapeutic opportunities in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* 4, 32.

Nguyen, P.V., and Woo, N.H. (2003). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Progress In Neurobiology* 71, 401-437.

Nickel, W., and Rabouille, C. (2008). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 148-155.

Niethammer, M., Kim, E., and Sheng, M. (1996). Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *The Journal Of Neuroscience : The Official Journal Of The Society For Neuroscience* 16, 2157-63.

Nimmrich, V., Grimm, C., Draguhn, A., Barghorn, S., Lehmann, A., Schoemaker, H., Hillen, H., Gross, G., Ebert, U., and Bruehl, C. (2008). Amyloid Oligomers (A 1-42 Globulomer) Suppress Spontaneous Synaptic Activity by Inhibition of P/Q-Type Calcium Currents. *Journal Of Neuroscience* 28, 788-797.

Noble, W., Hanger, D.P., Miller, C.C., and Lovestone, S. (2013). The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases. *Frontiers In Neurology* 4.(83)1:11.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., and Herbet, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. 1984.307:462-465

O

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron* 39, 409-421.

Oh, S., Hong, H., Hwang, E., and Sim, H. (2010). Intraneuronal β -amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* 119, 523-541.

Oh, S., Hong, H.S., Hwang, E., Sim, H.J., Lee, W., Shin, S.J., and Mook-Jung, I. (2005). Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mechanisms Of Ageing And Development* 126, 1292-1299.

Okamoto, K., Narayanan, R., Lee, S.H., Murata, K., and Hayashi, Y. (2007). The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 104, 6418-6423.

Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature Neuroscience* 7, 1104-1112.

P

Page, S., & Fletcher, T. (2006). Auguste D: One hundred years on: "The person not the case." *Dementia*, 5, 571 – 5

Paoletti, P., and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Current Opinion In Pharmacology* 7, 39-47.

Papadia S., Soriano FX., Leveillé F., Martel MA., Dakin K., Hansen H., Kaindl A., Sifringer M, Fowler J., Stefovskva V., McKenzie G., Caignon M., Corriveau R., Ghazal P., Horsburgh K., Yankner B., Wyllie D., Ikonomidou C., Hardingham G. (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses . *Nature Neuroscience* 11:476-487

Park, S., and Ferreira, A. (2005). The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates β -amyloid-induced neurodegeneration. *The Journal Of Neuroscience*. 25(22):5365–5375

Peineau, S., Taghibiglou, C., Bradley, C., Wong, T.P., Liu, L., Lu, J., Lo, E., Wu, D., Saule, E., and Bouschet, T. (2007). LTP Inhibits LTD in the Hippocampus via Regulation of GSK3 β . *Neuron* 53, 703-717.

Penzes, P., and VanLeeuwen, J. (2011). Impaired regulation of synaptic actin cytoskeleton in Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* 67, 184-192.

Petrini, E.M., Lu, J., Cognet, L., Lounis, B., Ehlers, M.D., and Choquet, D. (2009). Endocytic Trafficking and Recycling Maintain a Pool of Mobile Surface AMPA Receptors Required for Synaptic Potentiation. *Neuron* 63, 92-105.

Pooler, A.M., Usardi, A., Evans, C.J., Philpott, K.L., Noble, W., and Hanger, D.P. (2012). Dynamic association of tau with neuronal membranes is regulated by phosphorylation. *Neurobiology Of Aging* 33, 431.e27-431.e38.

R

Renner, M., Choquet, D., and Triller, A. (2009). Control of the Postsynaptic Membrane Viscosity. *Journal Of Neuroscience* 29, 2926-2937.

Renner, M., Specht, C.G., and Triller, A. (2008). Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Current Opinion In Neurobiology* 18, 532-540.

Reyes, J.F., Reynolds, M.R., Horowitz, P.M., Fu, Y., Guillozet-Bongaarts, A.L., Berry, R., and Binder, L.I. (2008). A possible link between astrocyte activation and tau nitration in Alzheimer's disease. *Neurobiology Of Disease* 31, 198-208.

Roberson, E.D., Scarce-Lavie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-., and Mucke, L. (2007). Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science* 316, 750-754.

Roberson, E., and Sweatt, J. (1996). Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *Journal Of Biological Chemistry*. 271:30436-0441

Roche, K., St, S., ley, McCallum, J., and Ly, C. (2001). Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nature*.4:794-802

S

Schlager, M. (2002). Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*. 18:601-35

Schlager, M., and Hoogenraad, C. (2009). Basic mechanisms for recognition and transport of synaptic cargos. *Mol Brain*.2:25

Schnell, E., and Sizemore, M. (2002). Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. *PNAS*.99: 13902-13907

Schubert, V. (2006). Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *The Journal Of Cell Biology* 172, 453-467.

Schubert, V., and Dotti, C.G. (2007). Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *Journal Of Cell Science* 120, 205-212.

Selkoe, D.J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research* 192, 106-113.

- Sergeant, N., Bretteville, A., and Hamdane, M. (2008). Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. 2008. *Expert Rev. Proteomics* 5(2), 207–224
- Sergeant, N., Delacourte, A., and Buée, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis Of Disease* 1739, 179-197.
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *Journal Of Neuroscience* 27, 2866-2875.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annual Review Of Biochemistry* 76, 823-847.
- Shipton, O.A., Leitz, J.R., Dworzak, J., Acton, C.E., Tunbridge, E.M., Denk, F., Dawson, H.N., Vitek, M.P., Wade-Martins, R., Paulsen, O., et al. (2011). Tau Protein Is Required for Amyloid -Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *Journal Of Neuroscience* 31, 1688-1692.
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nature Neuroscience* 8, 1051-1058.
- Snyder, S., Lador, U., Wade, W., and Wang, G. (1994). Amyloid-beta aggregation: selective inhibition of aggregation in mixtures of amyloid with different chain lengths. *Biophysical Journal*.67:1216-1238
- Sobczyk, A. (2005). NMDA Receptor Subunit-Dependent [Ca²⁺] Signaling in Individual Hippocampal Dendritic Spines. *Journal Of Neuroscience* 25, 6037-6046.
- Sontag, J.-, Nunbhakdi-Craig, V., White, C.L., Halpain, S., and Sontag, E. (2012). The Protein Phosphatase PP2A/B Binds to the Microtubule-associated Proteins Tau and MAP2 at a Motif Also Recognized by the Kinase Fyn: Implications for Tauopathies. *Journal Of Biological Chemistry* 287, 14984-14993.
- Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., and Murthy, N.V. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature Neuroscience* 5, 239-246.
- Staubli, U., Thibault, O., DiLorenzo, M., and Lynch, G. (1989). Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. *Behavioral Neuroscience* 103, 54-60.
- Steiner, P., Higley, M.J., Xu, W., Czervionke, B.L., Malenka, R.C., and Sabatini, B.L. (2008). Destabilization of the Postsynaptic Density by PSD-95 Serine 73 Phosphorylation Inhibits Spine Growth and Synaptic Plasticity. *Neuron* 60, 788-802.
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *Journal Of Biological Chemistry* 286, 4566-4575.
- Südhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual Review Of Neuroscience* 27, 509-547.

T

- Tada, T., and Sheng, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current Opinion In Neurobiology* 16, 95-101.
- Tai, H.C., Tai, H., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M.P., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2012). The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is

Associated With Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System. *The American Journal Of Pathology* 181, 1426-1435.

Takami, M., Nagashima, Y., Sano, Y., Ishihara, S., Morishima-Kawashima, M., Funamoto, S., and Ihara, Y. (2009). -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of -Carboxyl Terminal Fragment. *Journal Of Neuroscience* 29, 13042-13052.

Tashiro, K., Hasegawa, M., Ihara, Y., and Iwatsubo, T. (1997). Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport*. 8, 2797-2801

Terry-Lorenzo, R.T. (2005). Neurabin/Protein Phosphatase-1 Complex Regulates Dendritic Spine Morphogenesis and Maturation. *Molecular Biology Of The Cell* 16, 2349-2362.

Thornton, C., Bright, N., Sastre, M., Muckett, P., and Carling, D. (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid β -peptide exposure. *Biochemical Journal* 434, 503-512.

Tomiyama, T., Matsuyama, S., Iso, H., Umeda, T., Takuma, H., Ohnishi, K., Ishibashi, K., Teraoka, R., Sakama, N., Yamashita, T., et al. (2010). A Mouse Model of Amyloid Oligomers: Their Contribution to Synaptic Alteration, Abnormal Tau Phosphorylation, Glial Activation, and Neuronal Loss In Vivo. *Journal Of Neuroscience* 30, 4845-4856.

Tortosa, E., Montenegro-Venegas, C., Benoist, M., Hartel, S., Gonzalez-Billault, C., Esteban, J.A., and Avila, J. (2011). Microtubule-associated Protein 1B (MAP1B) Is Required for Dendritic Spine Development and Synaptic Maturation. *Journal Of Biological Chemistry* 286, 40638-40648.

Trepanier, C.H., Jackson, M.F., and MacDonald, J.F. (2012). Regulation of NMDA receptors by the tyrosine kinase Fyn. *FEBS Journal* 279, 12-19.

Trinczek, B., Biernat, J., and Baumann, K. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Molecular Biology Of the Cell*. 6:1887-1902

V

Vandersteen, A., Masman, M.F., de Baets, G., Jonckheere, W., van der Werf, K., Marrink, S.J., Rozenski, J., Benilova, I., de Strooper, B., Subramaniam, V., et al. (2012). Molecular Plasticity Regulates Oligomerization and Cytotoxicity of the Multi-peptide-length Amyloid- Peptide Pool. *Journal Of Biological Chemistry* 287, 36732-36743.

W

Walsh, D., Klyubin, I., Fadeeva, J., Cullen, W., and Anwyl, R. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*.416:535-539

Wang, Z., Edwards, J.G., Riley, N., Provance, D.W., Karcher, R., Li, X., Davison, I.G., Ikebe, M., Mercer, J.A., Kauer, J.A., et al. (2008). Myosin Vb Mobilizes Recycling Endosomes and AMPA Receptors for Postsynaptic Plasticity. *Cell* 135, 535-548.

Weingarten, M., and Lockwood, A. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *PNAS*. 72:1858-1862,

Wilhelmus, M.M., Grunberg, S.C., Bol, J.G., van Dam, A., Hoozemans, J.J., Rozemuller, A.J., and Drukarch, B. (2009). Transglutaminases and Transglutaminase-Catalyzed Cross-Links Colocalize with the Pathological Lesions in Alzheimer's Disease Brain. *Brain Pathology* 19, 612-622.

Wu, J.W., Herman, M., Liu, L., Simoes, S., Acker, C.M., Figueroa, H., Steinberg, J.I., Margittai, M., Kaye, R., Zurzolo, C., et al. (2013). Small Misfolded Tau Species Are Internalized via Bulk

Endocytosis and Anterogradely and Retrogradely Transported in Neurons. *Journal Of Biological Chemistry* 288, 1856-1870.

Wu, L., Ren, M., Wang, H., Kim, S.S., Cao, X., and Zhuo, M. (2008). Neurabin Contributes to Hippocampal Long-Term Potentiation and Contextual Fear Memory. *Plos ONE* 3, e1407.

Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., and Beggs, A. (1997). Competitive binding of α -actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature*.385:439-442

X

Xie, Z., Photowala, H., Cahill, M.E., Srivastava, D.P., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Haganir, R.L., and Penzes, P. (2008). Coordination of Synaptic Adhesion with Dendritic Spine Remodeling by AF-6 and Kalirin-7. *Journal Of Neuroscience* 28, 6079-6091.

Xu, W. (2011). PSD-95-like membrane associated guanylate kinases (PSD-MAGUKs) and synaptic plasticity. *Current Opinion In Neurobiology* 21, 306-312.

Y

Yang, S., Tang, Y., and Zucker, R. (1999). Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ elevation. *Journal Of Neurophysiology*.781-787

Yashiro, K., and Philpot, B.D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology* 55, 1081-1094.

Yen, S.H., Gaskin, F., and Fu, S.M. (1983). Neurofibrillary tangles in senile dementia of the Alzheimer type share an antigenic determinant with intermediate filaments of the vimentin class. *The American Journal Of Pathology* 113, 373-81.

Yoshihara, Y., de Roo, M., and Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Current Opinion In Neurobiology* 19, 146-153.

Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Bin Zhang, Huang, S., Iwata, N., Saido, T., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 53, 337-351.

Yu, J.-. (2006). Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *The FASEB Journal* 20, 1452-1461.

Yudowski, G.A., Olsen, O., Adesnik, H., Marek, K.W., and Brecht, D.S. (2013). Acute Inactivation of PSD-95 Destabilizes AMPA Receptors at Hippocampal Synapses. *Plos ONE* 8, e53965.

Z

Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-. (2010). A β Oligomers Cause Localized Ca^{2+} Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *Journal Of Neuroscience* 30, 11938-11950.

Zempel H., Luedtke J., Kumar Y., Biernat J., Dawson H., Mandelkow E., and Mandelkow E.M. (2013). Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TTL6 and spastin. *The EMBO Journal*.1-18