



HAL
open science

Tau nucléaire : un acteur clé dans le stress neuronal

Audrey Sultan

► **To cite this version:**

Audrey Sultan. Tau nucléaire : un acteur clé dans le stress neuronal. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT : 2010LIL2S038 . tel-00627214

HAL Id: tel-00627214

<https://theses.hal.science/tel-00627214>

Submitted on 28 Sep 2011

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

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

UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2

Ecole doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Audrey SULTAN

Tau nucléaire : un acteur clé dans le stress neuronal.

Soutenue publiquement le 17 décembre 2010 devant le jury composé de :

Mr le Pr. Jean Pierre BRION

Rapporteur

Mme le Dr. Anne Laurence BOUTILLIER

Rapporteur

Mr le Dr. Fabrice NESSLANY

Examineur

Mme le Dr. Eliette BONNEFOY

Examineur

Mr le Dr. Luc BUEE

Examineur

Mme le Dr. Marie-Christine GALAS

Directeur de Thèse

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publication:

Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC, Nuclear Tau : A key player in neuronal DNA protection. J Biol Chem.

Communications par affiche :

Sultan A, Nessler F, Marzin D, Talahari S, Loyens A, Mansuroglu Z, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC, (2009) Protéine Tau, bien plus qu'une protéine associée aux microtubules. 10^{ème} Réunion Francophone sur la maladie d'Alzheimer et les syndromes apparentés, Nantes, France, 20-22 octobre.

Sultan A, Nessler F, Colin M, Humez S, Bégard S, Talahari S, Loyens A, Lécolle K, Zommer N, Tran H, Mansuroglu Z, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC, (2010) Tau protein: much more than a MAP. The biology and pathology of tau and its role in Tauopathies, Robinson College, Cambridge, UK, 7 - 8 January.

Sultan A, Nessler F, Talahari S, Mansuroglu Z, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC, (2009) Quel rôle pour Tau nucléaire. 9^{ème} journée Andre Verbert, Lille, France, le 16 septembre.

Communications orales :

Sultan A, Bonnefoy E, Mansuroglu Z, Tran H, Loyens A, Nessler F, Buée L, Galas MC, (2009) What function for nuclear Tau ? Journée des doctorants 2009, Lille, France, 14-15 avril.

Sultan A, Nessler F, Violet M, Lécolle K, Tran H, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC, (2010) What function for nuclear Tau ? Journée des doctorants 2010, Lille, France, le 4 mars.

Résumé

Les protéines Tau sont impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives dénommées Tauopathies, dont la plus fréquente est la maladie d'Alzheimer. Ces maladies se caractérisent par une accumulation intracellulaire de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées sous forme de filaments. Ces lésions, dont l'origine et le rôle exact restent mal connus, sont au cœur d'un processus dégénératif conduisant à de nombreux troubles cognitifs et/ou moteurs et aboutissant le plus souvent à un syndrome de démence.

Les protéines Tau appartiennent à la famille des protéines associées aux microtubules. Elles sont principalement neuronales et majoritairement localisées dans les axones où elles modulent l'assemblage et la stabilisation des microtubules. La mise en évidence d'autres localisations au sein des neurones, notamment dans le noyau, suggère néanmoins que Tau pourrait être une protéine multifonctionnelle. Cependant, bien que Tau soit observée dans le noyau des neurones, sa fonction n'a jamais été étudiée.

Des études *in vitro* ont montré que la protéine Tau purifiée est capable de se lier et de stabiliser l'ADN, le protégeant de la dégradation par les DNAses ainsi que des altérations provoquées par les radicaux libres.

Les travaux présentés dans cette thèse ont eu pour objectif d'étudier *in situ*, la fonction de Tau nucléaire sur l'intégrité de l'ADN en condition de stress.

Dans ce but, nous avons développé et caractérisé des modèles dans lesquels un stress thermique ou un stress oxydant, un mécanisme précocement impliqué dans la maladie d'Alzheimer, module la quantité de Tau dans le noyau de neurones.

Nos résultats indiquent qu'en réponse à une hyperthermie, stress non toxique pour les cellules, Tau est déphosphorylée et s'accumule dans le noyau des neurones où elle se lie à l'ADN. Afin d'étudier le rôle de Tau nucléaire, nous avons analysé par Comet assay l'effet de l'hyperthermie sur l'intégrité de l'ADN dans des neurones sauvages ou déficients en Tau. Les résultats ont montré que ce type de stress entraîne des dommages à l'ADN spécifiquement dans les neurones déficients en Tau. Dans ces neurones, l'expression à l'aide de vecteurs adénoviraux de la Tau humaine possédant ou non une séquence de localisation nucléaire pour cibler Tau dans le compartiment nucléaire, prévient les dommages induits par le stress.

Inversement, une hypothermie induit une hyperphosphorylation de Tau et prévient son accumulation dans le noyau. Dans ce contexte, nous avons observé la présence de dommages à l'ADN dans les neurones sauvages.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'accumulation de Tau dans les noyaux protège l'ADN neuronal des dommages induits par un stress.

En conclusion, ce travail montre, pour la première fois, un nouveau rôle de Tau en tant qu'acteur essentiel de la réponse précoce à un stress dans le neurone où la protéine Tau protège l'intégrité de l'ADN.

Dans les Tauopathies, l'altération pathologique de Tau pourrait avoir un impact délétère sur sa fonction neuroprotectrice de l'ADN et contribuer ainsi à la physiopathologie de ces maladies.

Abstract

Tau proteins are involved in several neurodegenerative disorders, named Tauopathies. Alzheimer's disease (AD) is the most common Tauopathy. These diseases are characterized by an intracellular accumulation of abnormally and hyperphosphorylated Tau into filaments. The etiology and exact contribution of these lesions are poorly understood but they induce degenerative process leading to cognitive and/or motor troubles and in several cases, dementia.

Tau proteins belong to the family of microtubule associated proteins. They are mainly expressed in neurons and strongly localized in axons. Tau's function is to promote assembly and stabilization of microtubules. However, the observation of additional neuronal localizations suggests that Tau could be a multifunctional protein. Indeed, Tau has been visualized in the nucleus of neurons, but its nuclear function has never been studied.

In vitro studies have shown that purified Tau protein can bind to DNA. Tau-DNA complex could stabilize DNA, protecting it from DNase's degradation and from damages induced by hydroxyl free radicals.

Thus, the aim of this work was to study, *in situ*, the function of nuclear Tau on DNA integrity in stress condition.

In this purpose, we developed and characterized models in which thermal stress or oxidative stress, an early mechanism involved in AD, modulates Tau level in the nucleus of neurons.

Our results indicate that, in response to heat stress, a non toxic cellular stress, Tau is dephosphorylated and accumulates into the nucleus of neurons. Tau binds to DNA and heat stress increases Tau-DNA complex formation. To study the role of nuclear Tau, we analyzed the effects of heat stress on DNA integrity by Comet assay in wild type or Tau deficient neurons. Results showed that this stress causes DNA damages specifically in Tau deficient neurons. In these neurons, the expression of Tau with adenoviral vector encoding for hTau with or without a nuclear localization sequence to target Tau in the nuclear compartment prevents heat stress-induced DNA damages.

Conversely, cold stress induces Tau hyperphosphorylation and prevents its accumulation into the nucleus. In this context, we observed DNA damages in wild type neurons.

All these results suggest that nuclear accumulation of Tau protects neurons from stress-induced DNA damages.

In conclusion, this study enlightens, for the first time, a new role of Tau as an essential actor in the early response to cellular stress in neurons where Tau has a neuroprotective function on DNA in stress condition.

In Tauopathies, pathologic Tau alteration could lead to a loss of its neuroprotective function on DNA, that could likely contribute to the pathophysiology of the disease.

Sommaire

INTRODUCTION	7
1. LES PROTEINES TAU	7
1.1. Du gène à la protéine	7
1.2. Structure des protéines Tau	9
1.3. Modifications post traductionnelles	11
1.3.1. Phosphorylation	11
1.3.2. Autres modifications post-traductionnelles	14
1.4. Localisations et fonctions des protéines Tau	15
1.4.1. Localisation Cytoplasmique	15
1.4.2. Association à la membrane plasmique	20
1.4.3. Tau : une protéine nucléaire	21
1.5. Tau et autres partenaires	23
1.6. La phosphorylation : un régulateur de fonction des protéines Tau	24
1.6.1. Phosphorylation des protéines Tau : facteur d'assemblage des microtubules	24
1.6.2. Phosphorylation de Tau et transport axonal	25
1.6.3. Phosphorylation de Tau et développement	26
1.6.4. Phosphorylation et localisation subcellulaire de Tau	26
2. IMPLICATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE TAU DANS LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES	29
2.1. Concept de Tauopathie	29
2.1.1. Tauopathies d'origine traumatique	29
2.1.2. Tauopathies d'origine infectieuse	30
2.1.3. Tauopathies d'origine toxique	31
2.1.4. Tauopathies d'origine génétique	32
2.1.5. Tauopathies la plus fréquente : la maladie d'Alzheimer	34
2.2. Mécanismes d'agrégation de Tau	40
2.2.1. Agrégats de Tau	40
2.2.2. Conséquences fonctionnelles des modifications pathologiques de Tau et de la formation d'agrégats	47
2.3. Tauopathies et dommages à l'ADN	49
2.3.1. Origines des lésions de l'ADN dans les neurones	49
2.3.2. Dommages à l'ADN dans les Tauopathies	50
OBJECTIF DE L'ETUDE	52

**1. RÔLE DE TAU NUCLÉAIRE DANS LA PROTECTION DE L'ADN NEURONAL EN
CONDITION DE STRESS: IMPLICATION DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU..... 54**

1. 1. Effets d'un stress hyperthermique sur la localisation et la fonction de Tau dans le
noyau des neurones. 54

1. 2. Effet de l'hyperphosphorylation de Tau sur sa localisation subcellulaire et sa
fonction neuroprotectrice : implication dans les Tauopathies..... 59

1. 3. Stress hyperthermique et localisation subcellulaire de protéines partenaires de Tau 63

2. ISOFORMES DE TAU ET TRANSLOCATION NUCLÉAIRE..... 67**DISCUSSION****1. STRESS ET LOCALISATIONS DE TAU DANS LES NEURONES : IMPLICATION DE LA
PHOSPHORYLATION DE TAU..... 73**

1. 1. Mécanismes impliqués dans la translocation et accumulation nucléaire de Tau 73

1. 2. Implication de la phosphorylation de Tau dans sa localisation dans les neurones. .. 75

2. LIAISON TAU - ADN : QUEL(S) RÔLE(S) DANS LES NEURONES ?..... 77**3. EFFET DE L'HYPERPHOSPHORYLATION DE TAU SUR LE MAINTIEN DE
L'INTÉGRITÉ DE L'ADN : IMPLICATION DANS LES TAUOPATHIES..... 80****4. RÔLE CENTRAL DE LA PHOSPHORYLATION DANS LES DIFFÉRENTES
LOCALISATIONS ET FONCTIONS DE TAU..... 85****CONCLUSION ET PERSPECTIVES****BIBLIOGRAPHIE**

ANNEXE

Liste des abréviations

AA	Acide aminé	MCI	Mild cognitive impairment
Aβ	Amyloid β	NES	Nuclear export sequence
APOE	Apolipoprotéine E	NLS	Nuclear localization sequence
APP	Amyloid precursor protein	NOR	Nucleolar organization region
CamKII	Calcium–calmodulin-dependent protein kinase II	PDPK	Proline-directed protein kinase
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5	PEP	Parkinsonisme post encéphalitique
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation	PESS	Panencéphalite subaiguë sclérosante
DCB	Dégénérescence cortico-basale	PHF	Paired helical filaments
DFTP-17	Démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17	PKA	Protein kinase A
DIV	Day in vitro	PKC	Protein kinase C
DM1 et 2	Dystrophie myotonique de type 1 et 2	PLC-γ	Phospholipase C- γ
DNF	Dégénérescence neurofibrillaire	PP1	Protein phosphatase 1
FKBP52	FK506-binding protein 52	PP2A	Protein phosphatase 2A
GlcNAc	N-acetylglucosamine	PP2B	Protein phosphatase 2B
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3	PSP	Paralysie supranucléaire progressive
HDAC	Histone deacetylase	ROS	Reactive oxygen species
HSC70	Heat-shock cognate 70	Tau	Tubulin associated unit
HSP	Heat shock protein		
kDa	Kilodalton		
MA	Maladie d'Alzheimer		
MAP	Microtubule associated protein		

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du gène et des différentes isoformes de Tau dans le système nerveux central.	8
Figure 2 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de Tau (2+3+10+).	10
Figure 3 : Séquence primaire de l'isoforme de Tau la plus longue 2+3+10+.	13
Figure 4 : Représentation schématique simplifiée du transport axonal.	19
Figure 5 : Model possible d'interaction de Tau à l'ADN.	22
Figure 6 : Régulation de la dynamique microtubulaire par la phosphorylation de Tau.	24
Figure 7 : Mutations du gène codant pour Tau identifiées dans les DFTP-17.	32
Figure 8 : Photographie de Auguste D prise en 1902.	34
Figure 9 : Dépôts amyloïdes et plaques séniles.	36
Figure 10 : Les voies de métabolisme de l'APP.	37
Figure 11 : Dégénérescences neurofibrillaires observées dans la MA.	38
Figure 12 : Progression cérébrale de la DNF aux cours de la MA.	39
Figure 13 : Différentes lésions observées dans les Tauopathies.	41
Figure 14 : « Code barre » des Tauopathies.	43
Figure 15 : Phosphorylation physiologique et pathologique de Tau.	45
Figure 16 : Technique de Comet assay.	58
Figure 17 : Effet de l'hypothermie sur la phosphorylation et la localisation subcellulaire de Tau.	60

Figure 18: Effet de l'hypothermie sur la viabilité cellulaire.	61
Figure 19 : Etude de l'intégrité de l'ADN en condition de stress hyperthermique ou hypothermique dans les neurones sauvages ou déficients en Tau.	62
Figure 20 : Effet de l'hyperthermie sur la localisation subcellulaire de protéines partenaires de Tau.	65
Figure 21 : Représentation schématique du vecteur d'expression plasmidique pNTap.	69
Figure 22 : Etude de l'effet d'un stress hyperthermique sur la localisation subcellulaire des isoformes 3R et 4R de Tau dans les neurones.	70
Figure 23 : Etude de l'effet d'une hyperthermie sur la localisation subcellulaire des différentes isoformes de Tau.	71
Figure 24 : Analyse de la probabilité de liaison entre l'isoforme la plus longue de Tau (441 AA) et l'ADN.	82
Figure 25 : Model possible de protection de l'ADN neuronal par Tau en réponse à un stress oxydant.	84

Liste des tableaux

Tableau 1: Implication de la phosphorylation de certains sites de Tau dans sa localisation subcellulaire

85

Introduction

Introduction

1. Les protéines Tau

La description des protéines Tau pour « *Tubulin associated unit* » est fortement liée à la découverte des mécanismes de formation des microtubules. En effet, au début des années 1970, des études mettent en évidence la capacité des sous unités de tubuline à s'assembler pour former les microtubules (Shelanski *et al.*, 1973; Weisenberg, 1972). Ces études vont mener à la découverte des facteurs intervenant dans le processus d'assemblage de ces microtubules. Ainsi, la protéine Tau est décrite pour la première fois en 1975 comme étant une protéine co-purifiant avec la tubuline, capable de promouvoir l'assemblage des dimères de tubulines contrôlant de ce fait la polymérisation des microtubules *in vitro* (Cleveland *et al.*, 1977a; Cleveland *et al.*, 1977b; Weingarten *et al.*, 1975).

1. 1. Du gène à la protéine

Les protéines Tau sont synthétisées à partir d'un gène unique localisé sur le chromosome 17, à la position 17q21 (Neve *et al.*, 1986), il s'étend sur plus de 100 kb. Le transcrit primaire est constitué de 16 exons numérotés de -1 à 14 (Andreadis *et al.*, 1992). Dans le cerveau humain, les exons 4a et 8 ne sont pas présents dans les transcrits. Parmi ces exons, seul l'exon 4a est retrouvé au niveau du système nerveux périphérique. Sa présence conduit à l'expression d'une isoforme de Tau de plus haut poids moléculaire appelée « big Tau » (Georgieff *et al.*, 1993). L'exon 6 est détecté, mais de façon très minoritaire, dans certains ARNm de Tau dans le cerveau humain et conduit à l'expression d'une protéine Tau tronquée dans sa partie C-terminale (Luo *et al.*, 2004; Wei and Andreadis, 1998). L'exon 1 est situé dans la séquence promotrice et l'exon 14 fait partie de la région 3' non traduite de l'ARNm de Tau, ces deux exons sont donc transcrits mais pas traduits. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont des exons constitutifs (Goedert *et al.*, 1989a; Goedert *et al.*, 1989b).

Dans le cerveau humain, un épissage alternatif a lieu sur les exons 2, 3 et 10. L'épissage alternatif de ces 3 exons produit 6 combinaisons possibles, l'exon 3 n'apparaissant jamais indépendamment de l'exon 2 (Andreadis *et al.*, 1995). **Il y a donc six isoformes de Tau**

dans le cerveau humain (2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+) (Goedert *et al.*, 1989a; Goedert *et al.*, 1989b; Himmler, 1989a) (Figure 1).

Parmi ces isoformes, trois possèdent trois domaines répétés dans leur partie C-terminale. Ce sont les isoformes Tau 3R, les trois autres isoformes sont constituées de quatre domaines répétés et sont dites Tau 4R. Il faut noter que l'expression des protéines Tau est régulée au cours du développement et varie suivant les régions du cerveau. Ainsi, une seule isoforme est présente à la naissance et ne comporte aucun des inserts codés respectivement par les exons 2, 3 ou 10, il s'agit de l'isoforme foetale. Les autres isoformes apparaîtront au cours du développement (Figure 1) et seront toutes exprimées chez l'adulte mais en quantités inégales (Goedert and Jakes, 1990; Kosik *et al.*, 1989). Cette régulation spatio-temporelle est très importante pour le développement du tissu cérébral.

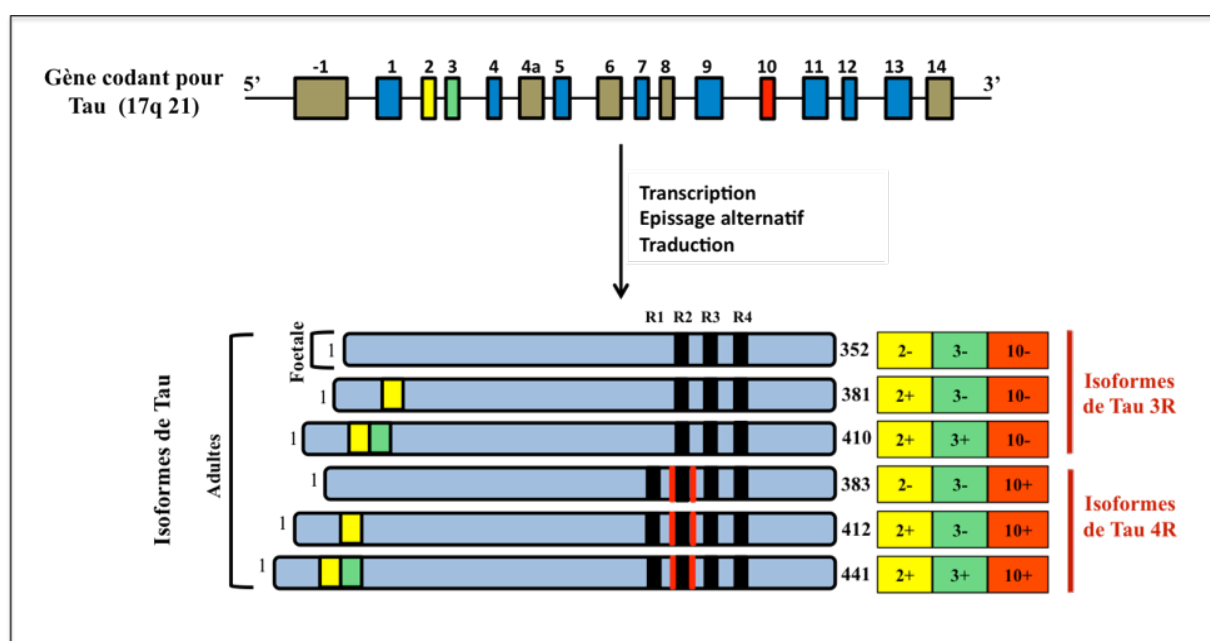


Figure 1: Représentation schématique du gène et des différentes isoformes de Tau dans le système nerveux central. Le gène codant pour Tau est localisé sur le chromosome 17 en position 17q21. Il est constitué de 16 exons. Suite à l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10, six isoformes différentes de Tau sont exprimées dans le cerveau humain, la présence de l'exon 3 étant dépendante de la présence de l'exon 2. A la naissance, une seule isoforme est présente, il s'agit de l'isoforme foetale (2-, 3-, 10-). Les autres isoformes apparaîtront au cours du développement. Adaptée selon (Buée *et al.*, 2000).

Dans le cerveau adulte humain, les quantités de Tau 4R et Tau 3R sont similaires (Goedert and Jakes, 1990; Hong *et al.*, 1998). Une rupture de cet équilibre s'avère délétère pour les neurones. En effet, dans plusieurs pathologies comme les démences fronto-temporales de type parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17), certaines mutations pathologiques de Tau entraînent une altération de son épissage alternatif conduisant à une

augmentation de l'expression des isoformes de Tau 4R (D'Souza *et al.*, 1999; Hutton *et al.*, 1998).

Cette dérégulation du ratio Tau 4R/3R faciliterait la formation d'agrégats insolubles de Tau et de ce fait participerait à l'apparition d'une neurodégénérescence (Gong *et al.*, 1998).

La distribution des différentes isoformes de Tau varie aussi en fonction des espèces (McMillan *et al.*, 2008; Takuma *et al.*, 2003) et au sein d'une même espèce, en fonction des sous populations neuronales considérées (Goedert *et al.*, 1989b). Chez l'homme, on les retrouve principalement dans les neurones du système nerveux central et périphérique ainsi que dans les oligodendrocytes (Lopresti *et al.*, 2001; Trojanowski *et al.*, 1989). Leur présence a également été reportée dans les astrocytes essentiellement en condition pathologique (Chin and Goldman, 1996; Simpson *et al.*, 2010). Les transcrits de tau, comme les protéines, sont également détectés, en quantité moindre, dans différents tissus périphériques tels que le cœur, les reins, les poumons, les muscles, le pancréas et les testicules (Gu *et al.*, 1996; Vanier *et al.*, 1998) ainsi que dans d'autres types cellulaires notamment dans les fibroblastes (Ingelson *et al.*, 1996; Matsuyama and Bondareff, 1994).

1. 2. Structure des protéines Tau

Dans le système nerveux central, la longueur des séquences de Tau varie de 352 à 441 AA. Sur électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE), les protéines Tau migrent dans une zone de masse moléculaire comprise entre 45 et 65 kDa.

D'un point de vue structural, elles sont organisées en plusieurs régions ayant des propriétés physico-chimiques distinctes. On distingue 2 principaux domaines : le domaine C-terminal ou domaine de liaison aux microtubules et le domaine N-terminal appelé domaine de projection (Figure 2):

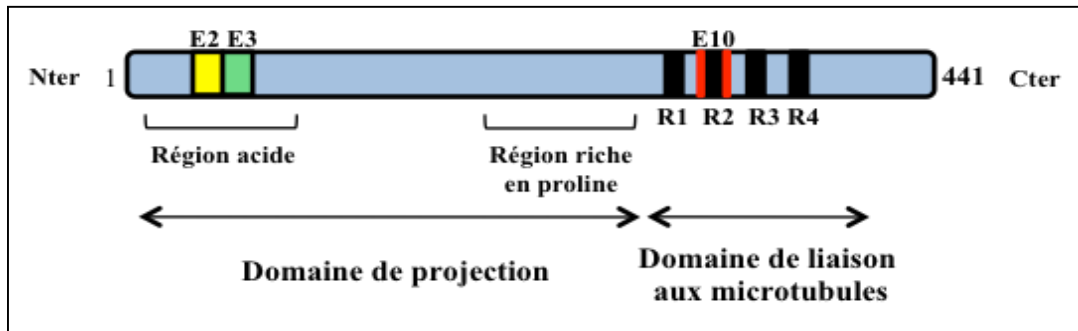


Figure 2 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de Tau (2+3+10+) L'isoforme de Tau (2+ 3+ 10+) est la plus longue dans le système nerveux central (441 AA). La partie N-terminale de Tau, appelée domaine de projection, est composée des exons 2 et 3, très acides, et d'une région riche en proline plus basique. La partie C-terminale de la protéine est constituée de 4 domaines de répétitions (R1 à R4). Adaptée selon (Buée *et al.*, 2000).

La partie C-terminale ou **domaine de liaison aux microtubules** est composée de motifs répétés dont les séquences sont codées par les exons 9 à 12. Ces motifs de 18 AA chacun sont hautement conservés et séparés les uns des autres par des zones de jonction de 13 ou 14 AA. (Goedert *et al.*, 1989b; Himmler *et al.*, 1989b; Lee *et al.*, 1989). Les motifs sont présents au nombre de 3 ou 4 (R1 à R4) en fonction de l'inclusion ou non de l'exon 10 déterminant la présence ou non du second motif répété (R2). Ainsi, parmi les 6 isoformes de Tau, 3 isoformes ne possèdent pas l'exon 10 (10-) au sein de leur séquence de liaison aux microtubules et sont donc constituées de 3 domaines de répétition (Tau 3R), les 3 autres isoformes possèdent l'exon 10 (10+) et sont donc constituées de 4 domaines de répétition (Tau 4R). La présence de ce 4^{ème} domaine modifie l'affinité de Tau pour les microtubules. En effet, les isoformes de Tau 4R ont une plus grande affinité pour les microtubules et sont plus efficaces pour promouvoir leur assemblage que les isoformes Tau 3R (Butner and Kirschner, 1991; Goedert and Jakes, 1990; Goode and Feinstein., 1994; Gustke *et al.*, 1994).

La partie N-terminale appelée **domaine de projection** diffère également entre les isoformes par la présence ou absence de séquences de 29 ou 58 AA due respectivement à l'insertion de l'exon 2 ou des exons 2 et 3 dans les ARNm de Tau. La présence de ces deux exons ainsi que des exons 1 et 2 confèrent à cette région un caractère acide. Elle est suivie d'une région plus basique riche en proline. Le domaine de projection se nomme ainsi car il se projette depuis la surface des microtubules vers le cytoplasme où il pourrait interagir avec d'autres éléments du cytosquelette et de la membrane plasmique (Brandt *et al.*, 1995; Hirokawa *et al.*, 1988; Reynolds *et al.*, 2008).

1. 3. Modifications post traductionnelles

1. 3. 1. Phosphorylation

La phosphorylation constitue la principale modification post-traductionnelle de Tau. En effet, les protéines Tau sont phosphorylables sur de nombreux sites. Dans le cerveau humain, l'isoforme de Tau la plus longue possède 80 résidus serines et thréonines ainsi que 5 résidus tyrosines (Goedert *et al.*, 1989a). Par conséquent, près de 20% de la protéine a la capacité d'être phosphorylée. L'état de phosphorylation de Tau résulte principalement des activités conjointes des kinases et phosphatases. Ces activités sont hautement régulées en fonction de la physiologie cellulaire et jouent un rôle essentiel dans la modulation des fonctions de Tau.

1. 3. 1. 1. Phosphorylation de Tau par les kinases

Parmi les sites phosphorylables de Tau, une soixantaine ont été, jusqu'à présent, décrits phosphorylés *in vitro* ou *in vivo* (pour revue (Gendron and Petrucelli, 2009); Hasegawa *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1993; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995a; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995b) (Figure 3).

In vitro, Tau est le substrat de nombreuses protéines kinases. Cependant, peu d'entre elles phosphorylent Tau *in vivo*. On peut diviser ces kinases en deux groupes majeurs en fonction du type d'épitope phosphorylé.

La plupart des kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau sont des protéines kinases reconnaissant des résidus sérines ou thréonines suivis d'une proline. Ces kinases sont communément regroupées sous le terme de **PDPK** (pour le terme anglais «proline-directed protein kinases»). Parmi ces kinases, on peut citer la «mitogen activated protein kinase» (MAPK) (Drewes *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 1997; Vulliet *et al.*, 1992), la «Tau-tubulin kinase» (Takahashi *et al.*, 1995a; Takahashi *et al.*, 1995b), les «cyclin-dependent kinase» dont cdk5 et cdc2 (Baumann *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995) et les «stress activating protein» (SAP) (Buee-Scherrer and Goedert, 2002; Goedert *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 2000).

D'autres kinases phosphorylent les résidus serines et thréonines et font partie du groupe des **non PDPK** (pour le terme anglais «non proline-directed protein kinases»). On retrouve notamment la «cyclin AMP-dependent protein kinase» (PKA) (Jicha *et al.*, 1999; Litersky and

Johnson, 1992) la «calcium- and calmodulin- dependent protein kinase II» (CaMKII) (Baudier and Cole., 1988; Steiner *et al.*, 1990), les «casein kinase» I et II (CKI et CKII) (Greenwood *et al.*, 1994; Pierre and Nunez, 1983), la «microtubule affinity regulating kinase» (MARK) (Drewes *et al.*, 1997) et la « protein kinase C» (PKC) (Correas *et al.*, 1992; Hoshi *et al.*, 1987).

Par le passé, La Glycogène synthétase 3 (GSK-3) était souvent décrite comme faisant partie du groupe des PDPK. Cependant, les résidus prolines ne sont pas toujours nécessaires à la phosphorylation par GSK-3 (Cho and Johnson, 2003; Cho and Johnson, 2004; Liu *et al.*, 2004a; Sengupta *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). De nombreuses études suggèrent que GSK-3 β est une des principales kinases phosphorylant Tau. En effet, sa surexpression dans les cellules entraîne une importante augmentation de la phosphorylation de Tau sur de nombreux sites (Cho and Johnson, 2003; Lovestone *et al.*, 1996; Michel *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1996). De plus, le traitement des cellules avec un inhibiteur de GSK-3 β , le lithium, atténue significativement la phosphorylation de Tau (Hong *et al.*, 1997; Lovestone *et al.*, 1999; Plattner *et al.*, 2006; Stambolic *et al.*, 1996). Ces données ajoutées au fait que GSK-3 β est fortement exprimée dans le cerveau humain (Woodgett, 1990), et localisée dans les neurones (Leroy and Brion, 1999) font de cette kinase une candidate de choix pour la phosphorylation de Tau *in vivo*.

Bien qu'étant phosphorylée majoritairement sur ses résidus serines et thréonines, Tau est également phosphorylée sur des résidus tyrosines (Tyr18, Tyr29, Tyr197 et Tyr394) (Derkinderen *et al.*, 2005; Lebouvier *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004; Vega *et al.*, 2005). La phosphorylation des tyrosines fait intervenir les protéines de la famille des scr notamment Fyn kinase (Lee *et al.*, 2004) et Lck (Williamson *et al.*, 2002) ainsi que la kinase abelson (c-abl) responsable de la phosphorylation de Tau sur la Tyr 394 (Derkinderen *et al.*, 2005).

Certains phospho-épitopes de Tau demandent une phosphorylation séquentielle pour être générés. La phosphorylation de ces sites dépend de l'action successive de plusieurs kinases (Sengupta *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 1996). De nombreuses études ont ainsi montré que l'activité de certaines kinases est influencée par une pré-phosphorylation de Tau. Par exemple, la phosphorylation de Tau par MARK, PKA ou encore DYRK peut être nécessaire pour permettre l'action de GSK-3 β (Li and Paudel, 2006; Liu *et al.*, 2004a; Nishimura *et al.*, 2004; Woods *et al.*, 2001). L'action de ces kinases peut aussi être indirecte. En effet, GSK-3, en activant un inhibiteur de la phosphatase PP2A, inhibe cette dernière, augmentant de ce fait la phosphorylation de Tau (Liu *et al.*, 2008).

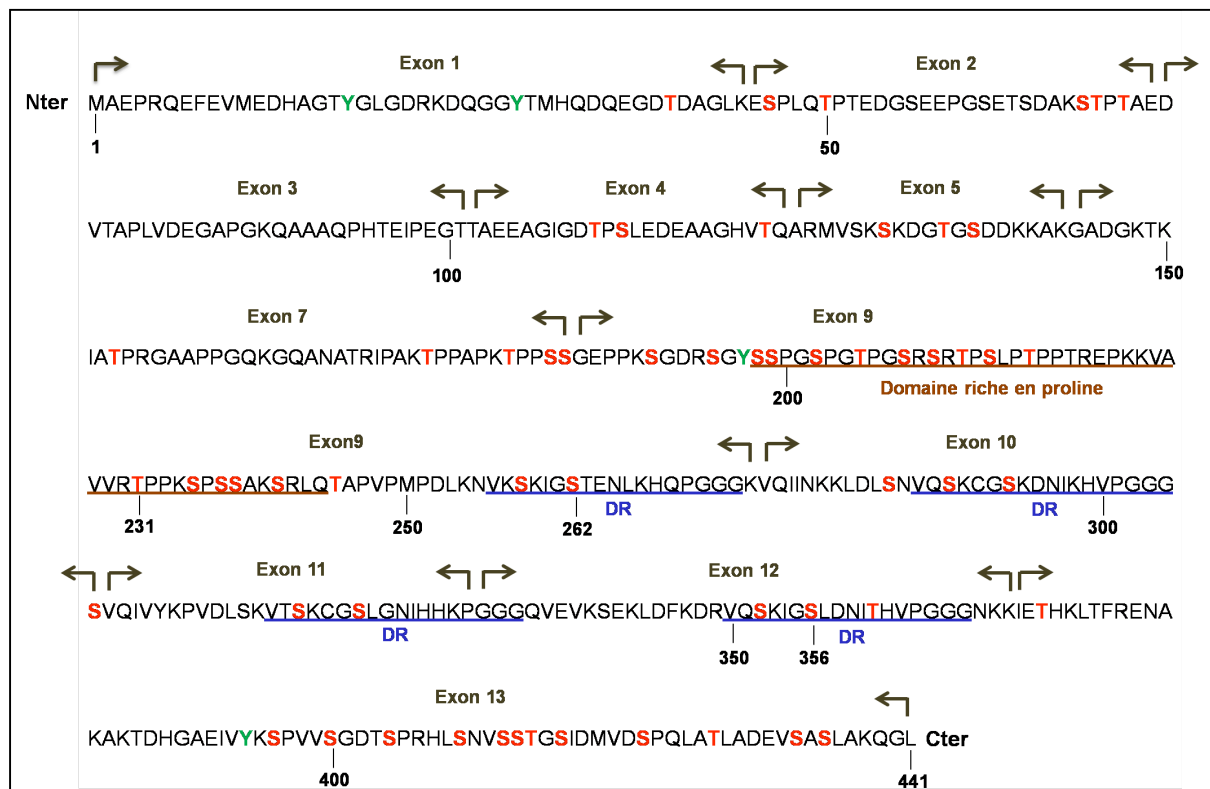


Figure 3: Séquence primaire de l'isoforme de Tau la plus longue 2+3+10+. Les protéines Tau sont constituées d'un domaine riche en proline dont la séquence est surlignée en marron et de domaines de répétés (DR) surlignés en bleu. Tau est une protéine phosphorylable sur de nombreux sites. Les sites dont la phosphorylation a été mise en évidence *in vitro* ou *in vivo* sont identifiés par une couleur : rouges pour les résidus sérines/thréonine (S/T) et vert pour les résidus tyrosines (T). Les chiffres indiquent la position des acides aminés.

1. 3. 1. 2. Déphosphorylation de Tau par les phosphatases

La régulation de la phosphorylation de Tau dépend également de l'activité de phosphatases. Les principales serine/thréonine phosphatases présentes dans le cerveau humain, à l'exception de la protéine phosphatase 2C (PP-2C) sont capables de déphosphoryler Tau. La protéine phosphatase 2A (PP2A) est la principale phosphatase du cerveau qui déphosphoryle Tau (Bennechib *et al.*, 2000; Goedert *et al.*, 1995; Kins *et al.*, 2001; Sontag *et al.*, 1996; Sontag *et al.*, 1999). Son inhibition entraîne une hyperphosphorylation de Tau sur de nombreux sites *in vivo* réduisant sa capacité à se lier et promouvoir l'assemblage des microtubules *in vitro* (Gong *et al.*, 2000). Ces résultats soulignent l'importance de PP2A dans la régulation de la phosphorylation de Tau. Les protéines Tau sont également déphosphorylées mais de manière moins importantes par les protéines phosphatases 1 et 2B (calcineurine) (PP1 et PP2B) ainsi que par la protéine phosphatase 5 (PP5) (Drewes *et al.*,

1993; Gong *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2006; Sontag *et al.*, 1996). En effet, dans le cerveau humain, les contributions relatives des phosphatases PP2A, PP1, PP5 et PP2B dans la régulation de la phosphorylation de Tau sont respectivement de 71, 11, 10 and 7% (Liu *et al.*, 2005). L'activité de ces phosphatases est soit directe en agissant directement sur la molécule soit plus indirecte en régulant l'activité des protéines kinases susceptibles de phosphoryler Tau (Benneceib *et al.*, 2000, Benneceib *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2010).

1. 3. 1. 3. Acteurs indirects de la phosphorylation de Tau

La phosphorylation de Tau peut être modulée indirectement par l'action d'autres protéines comme la protéine Pin 1, un membre du groupe des peptidyl-prolyl cis-trans isomerase impliquées dans l'isomérisation des liaisons peptidyl-prolyl. L'interaction entre Tau et Pin1 dépend de l'état de phosphorylation de Tau. En effet, Pin1 s'associe à Tau quand cette dernière est phosphorylée sur sa Thr231 (Lu *et al.*, 1999) et facilite sa déphosphorylation par PP2A, une phosphatase dépendante de la conformation *trans* des substrats p(Ser/Thr)-Pro (Galas *et al.*, 2006 ; Hamdane *et al.*, 2006 ; Thorpe *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000).

De plus, certains stress cellulaires sont connus pour moduler la phosphorylation de Tau. Ainsi, certains stress oxydants entraînent une déphosphorylation de Tau sur divers épitopes dans des cultures primaires de neurones embryonnaires murins (Davis *et al.*, 1997; Galas *et al.*, 2006; Zambrano *et al.*, 2004). Des résultats similaires sont observés *in situ* et *in vivo* suite à l'induction d'une hyperthermie (Galas *et al.*, 2006; Papasozomenos, 1996; Shanavas and Papasozomenos, 2000). Au contraire, une hypothermie conduit à une hyperphosphorylation de Tau sur de nombreux sites *in vivo* (Feng *et al.*, 2005; Planel *et al.*, 2004; Planel *et al.*, 2007). D'autres stress comme la privation de nourriture entraînent également une hyperphosphorylation de Tau (Yanagisawa *et al.*, 1999).

Par conséquent, la phosphorylation de Tau est hautement contrôlée et fait intervenir de nombreuses molécules.

1. 3. 2. Autres modifications post-traductionnelles

Bien que la principale modification post-traductionnelle de Tau soit la phosphorylation, les protéines Tau peuvent être également glycosylées et plus particulièrement O-glycosylées (Arnold *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2004b). La O-glycosylation se

caractérisé par l'addition d'un résidu de N-acétyl-glucosamine (O-GlcNAc) sur les résidus hydroxyl (-OH) des acides aminés sérines et thréonines des chaînes peptidiques des protéines (Haltiwanger *et al.*, 1997). Il existe une balance entre O-glycosylation et phosphorylation de Tau. En effet, la O-glycosylation régule la phosphorylation de Tau de façon site spécifique dans des cellules surexprimant de la Tau humaine ainsi que dans les cerveaux murins. Pour la plupart des sites étudiés, la présence de résidus O-GlcNAc réduit la phosphorylation de Tau (Liu *et al.*; 2004b; Yuzwa *et al.*, 2008). Cette relation inverse a également été mise en évidence dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer chez lesquels les protéines Tau hyperphosphorylées contiennent 4 fois moins de résidus O-GlcNAc comparées aux protéines Tau dans un état de phosphorylation normal (Liu *et al.*, 2009).

D'autre part, lorsque la protéine est hyperphosphorylée, le taux d'incorporation de résidus O-GlcNAc diminue (Lefebvre *et al.*, 2003b).

Le rôle de la glycosylation de Tau sur ses fonctions physiologiques est à ce jour mal connu. Elle pourrait intervenir dans l'interaction avec la tubuline et jouer un rôle dans la localisation subcellulaire et la dégradation de Tau (Kamemura and Hart., 2003; Lefebvre *et al.*, 2003a; Lefebvre *et al.*, 2003b).

Tau fait l'objet d'autres modifications post traductionnelles incluant la N-glycosylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, la nitration, la polyamination, et la protéolyse. En condition physiologique, la présence de ces modifications reste néanmoins limitée. Une augmentation de ces modifications est souvent observée dans plusieurs maladies neurodégénératives impliquant Tau telles que la maladie d'Alzheimer (pour revue (Gong *et al.*, 2005)). Certaines de ces modifications comme la glycation sont d'ailleurs uniquement observées en condition pathologique (Ledesma *et al.*, 1994). Cependant, les effets de ces différentes modifications sur les protéines Tau sont encore mal connus.

1. 4. Localisations et fonctions des protéines Tau

1. 4. 1. Localisation Cytoplasmique

Les protéines Tau sont principalement exprimées dans les neurones et préférentiellement localisées dans les axones associées aux microtubules (Binder *et al.*, 1985; Brion *et al.*, 1988; Schoenfeld and Obar, 1994; Trojanowski *et al.*, 1989) bien que leur présence soit également observée dans le compartiment somatodendritique (Ferreira *et al.*,

1987; Papasozomenos and Binder, 1987). D'un point de vue fonctionnel, elles influent sur la structure et la dynamique des microtubules. Leur présence est primordiale pour la croissance neuritique, le développement de la polarité et le transport axonal. Elles ont également un rôle de médiateur, placées entre les microtubules et les composants de la cellule en interaction avec ces microtubules.

1. 4. 1. 1. Tau et dynamique microtubulaire

Les microtubules sont des fibres constitutives du cytosquelette, au même titre que les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires. Ce sont des tubes constitués de protofilaments de tubuline, généralement 13 par microtubule. Chaque protofilament se compose de dimères de tubuline α et β reliées par des liaisons non covalentes. Les extrémités des microtubules se polymérisent et dépolymérisent en permanence. Ces structures sont donc particulièrement labiles. Elles sont notamment régulées par un certain nombre de protéines appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules, les MAPs (pour le terme anglais « microtubules associated proteins ») (pour revue (Wade, 2009)). Dans les neurones, les protéines Tau sont les principales MAPs. D'autres MAPs, de poids moléculaire plus élevé comme MAP2 sont également présentes (Murphy *et al.*, 1975) et ont une localisation principalement somato-dendritique (Binder *et al.*, 1985; Biranowska *et al.*, 2000; Kempf *et al.*, 1996). Tau se lie aux microtubules via les domaines de liaisons aux microtubules situés dans sa partie C-terminale. Sa fonction première est de stabiliser et contrôler la polymérisation des microtubules en se liant aux dimères de tubulines favorisant leur assemblage ainsi que leur élongation et inhibant leur dépolymérisation (Drechsel *et al.*, 1992; Weingarten *et al.*, 1975; Witman *et al.*, 1976). La capacité d'interaction Tau-tubuline varie en fonction des isoformes de Tau et plus précisément dépend du nombre de domaines de répétition, les isoformes de Tau 4R ayant une plus grande affinité pour les microtubules que les isoformes Tau 3R (Butner and Kirschner, 1991; Goedert and Jakes, 1990a; Gustke *et al.*, 1994; Lu and Kosik, 2001). Ceci est notamment dû au fait que la région la plus efficace pour l'assemblage des microtubules se situe entre les domaines de répétition 1 et 2, en particulier au niveau de la séquence KVQIINKK uniquement présente chez les Tau 4R et qui possède une forte affinité pour les microtubules (Goode and Feinstein, 1994). La liaison Tau-microtubule est également régulée par l'état de phosphorylation des protéines Tau. En effet, dans un état peu phosphorylé, Tau est associée aux microtubules. En revanche, une augmentation de la phosphorylation de la protéine semble diminuer son affinité pour les

microtubules entraînant leur dépolymérisation (Alonso *et al.*, 1994; Cowan *et al.*, 2010; Lindwall and Cole, 1984) (c.f. 1. 6. 1. *Phosphorylation des protéines Tau : facteur d'assemblage des microtubules*).

Le domaine de projection de Tau intervient également dans la dynamique microtubulaire en déterminant l'espace entre les microtubules dans l'axone et modulant de ce fait le diamètre axonal (Chen *et al.*, 1992). En effet, chez des souris déficientes en Tau, certains axones ont un calibre diminué. Dans ces axones, les microtubules sont désorganisés et moins stables (Harada *et al.*, 1994).

Cependant, les souris déficientes en Tau restent viables, capables de se reproduire et ne présentent pas de caractéristiques physiques particulières à l'exception d'une faiblesse musculaire et une hyperactivité (Ikegami *et al.*, 2000). Ceci est probablement dû à une redondance de fonction et /ou à une surrégulation compensatoire d'autres MAPs (Dawson *et al.*, 2001; DiTella *et al.*, 1996; Harada *et al.*, 1994). Chez des souris déficientes en Tau, il a ainsi été observé une augmentation de l'expression de MAP1A dans certains compartiments du cerveau (Harada *et al.*, 1994).

Dans les neurones périphériques, une séquence supplémentaire est présente du côté N-terminale de la protéine codée par l'exon 4a générant une isoforme spécifique de taille plus importante appelée « big Tau » (Andreadis *et al.*, 1995; Couchie *et al.*, 1992; Georgieff *et al.*, 1993). Dans ces neurones, les axones ont un diamètre plus important et sont capables de projeter sur de longues distances, ce qui souligne l'importance de Tau et surtout cette région dans la dynamique microtubulaire.

1. 4. 1. 2. *Polarité neuronale et croissance neuritique*

Les neurones sont des cellules du système nerveux spécialisées dans la communication et le traitement d'informations. Chaque neurone est composé d'un corps cellulaire ainsi que deux types de ramifications : les dendrites et un axone. La mise en place de la polarité axonale est fondamentale pour la différenciation et la diversité des fonctions neuronales. Bien que l'établissement de cette asymétrie cellulaire nécessite l'activité conjointe de composants membranaires, cytosoliques et du cytosquelette, les MAPs sont également fortement impliquées dans les processus de différenciation et de croissance neuritique.

En effet, dans des cellules non neuronales, l'expression de Tau induit la formation de longues extensions cytoplasmiques (Knops *et al.*, 1991) et stabilise les microtubules (Knowles *et al.*, 1994). De plus, des neurones hippocampiques issus de cultures primaires de souris déficientes

en Tau sont caractérisés par un retard de croissance des axones et dendrites dans les premiers jours de mise en culture reflétant un retard de maturation des neurones et du développement de la polarité. Dans ce modèle, l'expression de la protéine Tau humaine prévient ce retard de croissance (Dawson *et al.*, 2001). Une inhibition de la croissance axonale a également été observée dans des cultures primaires où Tau a été invalidée par une technique d'ARN antisense (Caceres and Kosik, 1990). D'autre part, les souris doublement invalidées pour les gènes codant pour MAP1B et Tau présentent des déficits sévères de l'élongation axonale, une désorganisation microtubulaire et un retard de la migration axonale. La croissance des neurites dans les cultures de neurones issus de ces souris est également inhibée (Takei *et al.*, 2000). Ces données indiquent que Tau et d'autres MAPs pourraient agir en coopération pour réguler l'élongation axonale et la migration cellulaire. Il a ainsi été mis en évidence un rôle synergique de Tau et MAP1B dans le développement de la polarité axonale dans des neurones hippocampiques (González-Billault *et al.*, 2002).

1. 4. 1. 3. Transport axonal

Les déplacements au sein des cellules se font entre les microfilaments d'actine et les microtubules. Les microtubules sont très nombreux dans les neurones, en particulier dans les dendrites et les axones. Ils permettent d'acheminer divers composants vers leurs extrémités, véritables rails sur lesquels des moteurs moléculaires, attachés aux éléments à transporter, se déplacent. Ces derniers consistent, par exemple, en des vésicules synaptiques ou des mitochondries. Ce transport est assuré par des protéines motrices se liant aux microtubules : les dynéines et les kinésines. Dans les axones, les kinésines assurent le transport antérograde vers l'extrémité (+) du microtubule (du corps cellulaire vers la terminaison axonale), tandis que les dynéines, en s'associant à un complexe protéique appelé dynactine (Gill *et al.*, 1991), assurent le transport rétrograde, c'est à dire vers l'extrémité (-) des microtubules (Hirokawa *et al.*, 1991; Paschal and Vallee 1987; Vale *et al.*, 1985) (Figure 4).

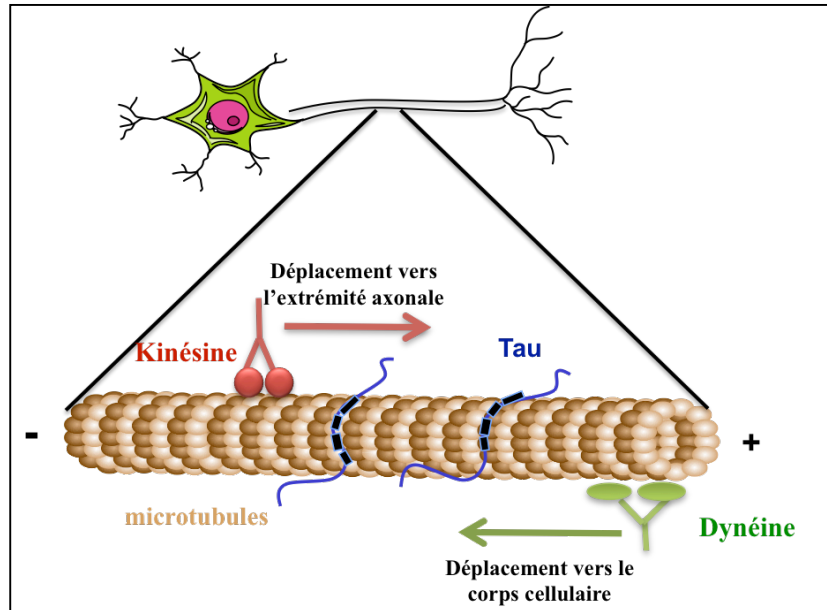


Figure 4 : Représentation schématique simplifiée du transport axonal. Dans les axones, les kinésines assurent le transport antérograde vers l'extrémité (+) du microtubule (du corps cellulaire vers la terminaison axonale), tandis que les dynéines assurent le transport rétrograde, c'est à dire vers l'extrémité (-) des microtubules (de la terminaison axonale vers le corps cellulaire).

Les protéines Tau régulent le transport axonal en intervenant sur l'activité de ces protéines motrices (Dixit *et al.*, 2008; Stoothoff *et al.*, 2009; Vershinin *et al.*, 2007). En effet, en se liant aux microtubules, Tau entre en compétition avec les kinésines et les dynéines interférant avec leur activité. Par ce mécanisme, Tau est capable d'inhiber l'activité des kinésines *in vitro* et *in vivo* entraînant une inhibition du transport antérograde et conduisant de ce fait à une inhibition du transport des vésicules et mitochondries (Ebneht *et al.*, 1998; Tatebayashi *et al.*, 2004; Trinczek *et al.*, 1999; Vershinin *et al.*, 2007). De plus, la surexpression de Tau dans des neurones bloque le transport des neurofilaments, des peroxysomes et des vésicules dans les corps cellulaires (Goldsbury *et al.*, 2006; Stamer *et al.*, 2002). En revanche, peu de choses sont connues concernant l'effet de Tau sur le transport rétrograde. Un modèle de régulation des kinésines et dynéines par Tau a été proposé dans lequel Tau interfère également avec les dynéines mais de façon différente. La présence de Tau au niveau des microtubules tendrait à inverser la direction des dynéines tandis que les kinésines, en présence de Tau se détacheraient des microtubules (Dixit *et al.*, 2008).

Ces données suggèrent que Tau contrôle le trafic intracellulaire en modifiant l'attachement et le détachement des protéines motrices, en particulier en réduisant l'attachement des kinésines aux microtubules sans changer la vitesse et la direction de déplacement des protéines, et en modifiant le mouvement des dynéines (Dixit *et al.*, 2008; Trinczek *et al.*, 1999). Il faut cependant noter que les souris déficientes en Tau ne présentent pas de déficits majeurs du transport axonal (Yuan *et al.*, 2008) indiquant, une nouvelle fois, que d'autres protéines associées aux microtubules ou d'autres mécanismes compensent les altérations de Tau *in vivo*.

1. 4. 1. 4. Autres fonctions

Tau interagit avec d'autres protéines du cytosquelette telles que la spectrine (Carlier *et al.*, 1984) ou les filaments d'actine *in vitro* (Correas *et al.*, 1990; Griffith and Pollard, 1982a; Griffith and Pollard, 1982b; He *et al.*, 2009; Moraga *et al.*, 1993; Selden and Pollard, 1983; Yamauchi and Purich, 1993) et *in situ* (Yu and Rasenick, 2006). Cette association fait intervenir le domaine de liaison aux microtubules de Tau. Cependant, la présence du domaine riche en proline semble nécessaire suggérant une fonction régulatrice de ce domaine dans la liaison Tau-actine (He *et al.*, 2009; Yu and Rasenick, 2006). A travers cette interaction, Tau stabilise, organise les filaments d'actine et participe au maintien de l'architecture cellulaire.

Des études suggèrent également une interaction entre Tau et des organelles cytoplasmiques telles que les mitochondries (Jung *et al.*, 1993; Rendon *et al.*, 1990) et certaines fractions membranaires de l'appareil de golgi (Farah *et al.*, 2006). Par ces associations, les protéines Tau pourraient jouer un rôle de médiateur entre les microtubules et divers éléments de la cellule.

1. 4. 2. Association à la membrane plasmique

Par l'intermédiaire de son domaine de projection, Tau interagit avec la membrane plasmique des cellules neuronales (Arrasate *et al.*, 2000; Brandt *et al.*, 1995; Ekinici and Shea, 2000; Mass *et al.*, 2000). Plus précisément, le domaine impliqué dans cette liaison semble faire intervenir une séquence de type PXXP située dans la région riche en proline de Tau et le domaine SH3 de protéines membranaires interagissant avec Tau telles que cSrc, Fgr, Grb2, PLC- γ . Cette interaction a été plus largement décrite avec la protéine Fyn, une kinase de la famille src (Lee *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2008). En effet, plusieurs études ont mis en

évidence une interaction entre le domaine de projection de Tau et le domaine SH3 de Fyn (Klein *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2008). Fyn est une protéine localisée dans des micro-domaines membranaires appelés radeaux lipidiques (Liang *et al.*, 2001; Webb *et al.*, 2000). Sa fonction est de phosphoryler des résidus tyrosines de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation régulant ainsi leurs fonctions. Dans les neurones, elle est notamment impliquée dans le contrôle de la croissance neuritique au cours de la différenciation neuronale. En effet, les neurones issus des souris déficientes en protéines Fyn présentent des retards de croissance des neurites (Beggs *et al.*, 1994; Ignelzi *et al.*, 1994). A travers cette interaction, Tau pourrait intervenir dans les voies de transduction des signaux impliquant les tyrosines kinases de la famille src.

Tau interagit également, *in situ*, avec le domaine SH3 de la phospholipase C- γ (PLC- γ) (Jenkins and Johnson, 1998), une enzyme localisée sur la face interne de la membrane plasmique. La PLC- γ est une enzyme activée par la phosphorylation de certaines de ses tyrosines. Suite à son activation, elle hydrolyse le phosphatidyl-inositol-diphosphate. Cette réaction génère deux messagers intracellulaires : l'inositol triphosphate qui induit la libération de calcium et le diacylglycérol qui active la protéine kinase C. Cette activation est un des plus précoces évènements conduisant à la régulation des fonctions cellulaires par de nombreuses molécules de signalisation intracellulaire. Une étude a montré que, *in vitro*, Tau s'associe spécifiquement avec PLC- γ et l'active. Cette activation est facilitée par la présence d'acides gras insaturés comme l'acide arachidonique. Cette étude suggère que la PLC- γ , en l'absence de phosphorylation de ses tyrosines, pourrait également être activée par Tau (Hwang *et al.*, 1996). Les protéines Tau participent donc aussi à la régulation de signaux de transduction à travers l'activation de la PLC- γ .

1. 4. 3. Tau : une protéine nucléaire

Bien que moins décrite dans la littérature, Tau a également été observée dans le noyau de neurones (Brady *et al.*, 1995; Gomez de Barreda *et al.*, 2010) ainsi que dans plusieurs autres lignées de types neuronales (Arrasate *et al.*, 2000; Greenwood and Johnson, 1995; Loomis *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993) et non neuronales comme les fibroblastes et lymphocytes (Sjoberg *et al.*, 2006; Thurston *et al.*, 1996).

Dans les cellules de neuroblastomes et les fibroblastes, Tau est localisée dans les régions d'organisation nucléolaire (NOR) des chromosomes acrocentriques dans les cellules en

mitose et dans des régions fibrillaires denses du nucléole lorsque les cellules sont en interphase (Loomis *et al.*, 1990; Thurston *et al.*, 1996). Plus récemment, une étude a mis en évidence, dans des cellules Hela et dans les fibroblastes humains, la présence de Tau dans des régions du nucléole et plus précisément au niveau de l'hétérochromatine constitutive. Le nucléole étant un sous-compartiment cellulaire du noyau où se produit la transcription des ARN ribosomiques, ces résultats suggèrent que Tau pourrait intervenir dans l'organisation nucléolaire et /ou dans l'hétérochromatisation des gènes codant pour les ARN (Sjoberg *et al.*, 2006).

Par ailleurs, des études réalisées *in vitro* ont montré que Tau est capable de se lier à l'ADN (Hua and He, 2003; Qu *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008), et a une plus grande affinité pour l'ADN que pour les microtubules (Corces *et al.*, 1980). De plus, Tau semble se lier préférentiellement à certaines séquences, en particulier aux séquences riches en nucléotides A/T (Sjoberg *et al.*, 2006). En se liant à l'ADN, Tau est capable de le protéger. En effet, *in vitro*, cette interaction protège l'ADN contre la dénaturation thermique et favorise sa renaturation (Hua and He, 2003). Plus récemment, des travaux ont permis de mettre en évidence une association spécifique entre Tau et le petit sillon de l'ADN, vraisemblablement à la fois par son domaine riche en proline et son domaine de liaison aux microtubules. Le complexe ainsi formé protège l'ADN de la dégradation par la Dnase I et de l'attaque par les radicaux libres (Wei *et al.*, 2008) (Figure 5).

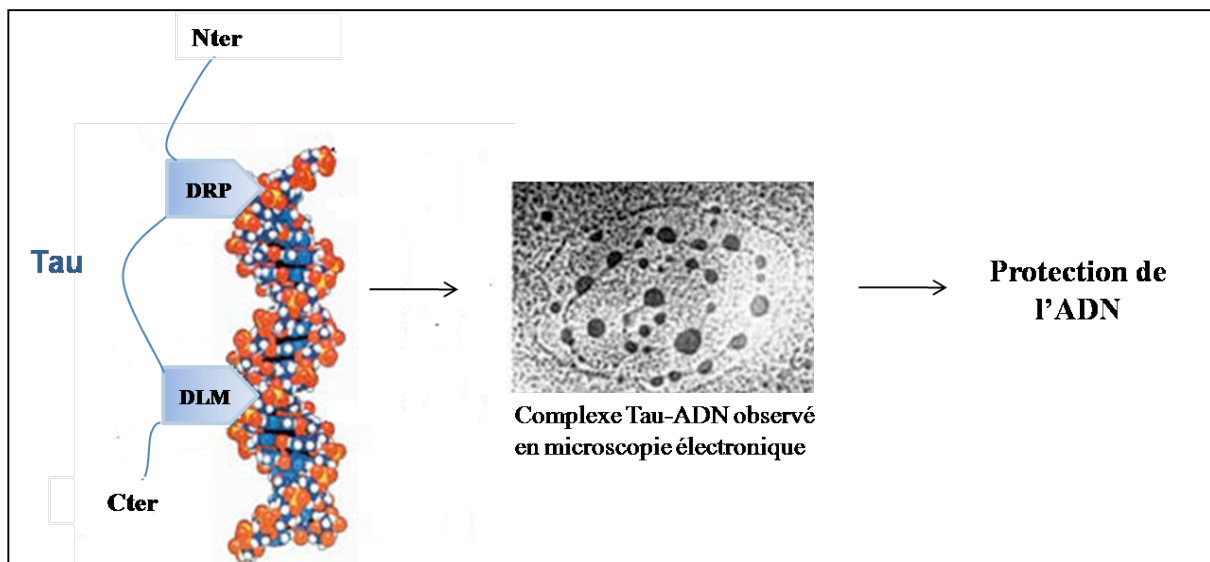


Figure 5 : Model possible d'interaction de Tau à l'ADN. Tau se lie spécifiquement dans petit sillon de l'ADN par l'intermédiaire de son domaine riche en proline (DRP) et de son domaine de liaison aux microtubules (DLM). Le complexe Tau-ADN ainsi formé protège l'ADN. Adaptée selon (Wei *et al.*, 2008).

D'autre part, des aberrations chromosomiques (translocation, décondensation, aneuploïdies, coupures de l'ADN...) ont été observées dans les lymphocytes et fibroblastes de patients portant la mutation P301L sur la protéine Tau, mutation associée à les démences fronto-temporales (Rossi *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats renforce l'idée que Tau exercerait un rôle stabilisateur et protecteur vis-à-vis de l'ADN.

Ces données sont cependant nuancées par une récente étude *in vitro* montrant que Tau, en se liant à l'ADN, altère sa conformation et de ce fait diminue sa stabilité le rendant plus vulnérable à la digestion par les DNases. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces altérations pourrait conduire, à terme, à une dysfonction neuronale notamment suite à une dérégulation de l'expression des gènes (Padmaraju *et al.*, 2010).

En conclusion, de plus en plus d'études décrivent une localisation nucléaire de Tau dans divers types cellulaires. Bien que sa fonction sur l'ADN ait été étudiée *in vitro*, le rôle biologique de Tau dans le noyau des neurones reste, à ce jour, inconnu.

1. 5. Tau et autres partenaires

Tau est une protéine s'associant principalement avec la tubuline mais également avec d'autres protéines structurales comme l'actine et certains éléments de la cellule.

Plusieurs travaux ont également décrit des interactions avec diverses protéines telles que des protéines chaperones comme HSP27 (Shimura *et al.*, 2004b), HSP70, HSP90 (Dou *et al.*, 2003), HSC 70 (Sarkar *et al.*, 2008; Shimura *et al.*, 2006) le complexe HSC70-HSP70 (Elliot *et al.*, 2007). Certaines de ces chaperones, notamment HSP27, HSP70 et HSP90 pourraient par ailleurs favoriser la déphosphorylation de Tau (Dou *et al.*, 2003; Shimura *et al.*, 2004b).

Tau se lie également à HDAC6 (Ding *et al.*, 2008; Perez *et al.*, 2009), une déacétylase exprimée dans les neurones qui régule l'acétylation de la tubuline. Par cette association, Tau inhibe sa fonction de déacétylation entraînant une augmentation de l'acétylation de la tubuline (Perez *et al.*, 2009).

Tau s'associe aussi *in vitro* et dans des neurones avec Che-1, une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Barbato *et al.*, 2003; Fanciulli *et al.*, 2000). En effet, une étude a montré que Che-1 était présente dans les neurones du cervelet localisée dans le cytosol et le noyau. Dans ces neurones, la protéine s'associe à Tau. Par ailleurs, la quantité de Tau associée à Che-1 varie en condition de mort neuronale et plus précisément diminue lorsque les cellules entrent en apoptose (Barbato *et al.*, 2003).

Récemment, une interaction entre Tau et FKBP52 a également été montrée (Chambraud *et al.*, 2010). FKBP52 fait partie de la famille des immunophyllines, des protéines capables de se lier à des médicaments immunosuppresseurs, comme FK506 ou la rapamicyne, permettant leur effet antirejet de greffes d'organes. FKBP52 a également une activité peptidyl prolyl cis-trans isomerase, similaire à Pin1. Par ailleurs, la protéine est plus abondante dans le cerveau que dans le système immunitaire laissant suspecter d'autres fonctions physiologiques. Récemment, plusieurs études ont ainsi décrit un rôle régulateur de l'assemblage des microtubules. En effet, FKBP52, en interagissant avec la tubuline, favorise la dépolymérisation des microtubules (Chambraud *et al.*, 2007).

De plus, *in vitro*, la protéine se lie à Tau et en particulier lorsque cette dernière est hyperphosphorylée et inhibe sa capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules. Dans des cellules PC12 en différenciation et exprimant stablement FKBP-52, celle-ci inhibe l'accumulation de Tau ainsi que la croissance des neurites (Chambraud *et al.*, 2010).

1. 6. La phosphorylation : un régulateur de fonction des protéines Tau

1. 6. 1. Phosphorylation des protéines Tau : facteur d'assemblage des microtubules

La capacité de liaison de Tau aux microtubules est régulée au niveau post traductionnel principalement par sa phosphorylation, véritable modulateur de l'affinité de Tau pour les microtubules. En 1984, une étude a montré que la phosphorylation de Tau régule négativement son activité d'assemblage et de stabilisation des microtubules (Lindwall and Cole, 1984) (Figure 6).

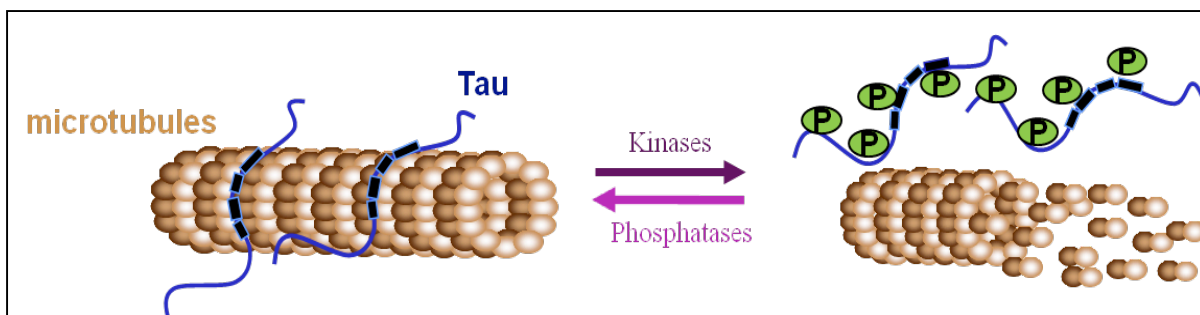


Figure 6: Régulation de la dynamique microtubulaire par la phosphorylation de Tau. Dans un état peu phosphorylé, Tau se lie aux microtubules. Une augmentation de la phosphorylation de Tau entraîne son détachement des microtubules et leur désassemblage.

Dans un neurone, la dynamique des microtubules est assurée par un équilibre entre les formes peu phosphorylées et les formes phosphorylées de Tau. Certains sites semblent fortement impliqués dans la capacité d'interaction Tau - microtubules. Ainsi, la phosphorylation de motifs KXGS situés dans les domaines répétés de Tau réduit fortement la liaison de Tau aux microtubules *in vitro* (Biernat *et al.*, 1993) et probablement *in vivo* (Biernat and Mandelkow, 1999; Drewes *et al.*, 1995). De plus, *in vitro*, la phosphorylation de la serine 262 seule est suffisante pour atténuer de manière significative la liaison Tau-microtubule (Biernat *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2009). Cependant, la phosphorylation de ce site ne suffit pas à inhiber totalement l'interaction de la protéine avec les microtubules (Seubert *et al.*, 1995). *In situ*, la phosphorylation d'au moins deux motifs est nécessaire (en particulier les serine 262 et 356) pour diminuer la liaison aux microtubules et faciliter la formation de processus cellulaires (Biernat and Mandelkow, 1999). La phosphorylation de la thréonine 231 (pThr231) par GSK-3 β joue également un rôle prépondérant dans la régulation de l'interaction. En effet, la phosphorylation de ce site diminue fortement la capacité de liaison de Tau aux microtubules *in situ* (Cho and Johnson, 2003) et affecte leur stabilisation (Cho and Johnson, 2004). De plus, la prolyl isomérase Pin1, en se liant à la Thr 231 phosphorylée, facilite la déphosphorylation du site par PP2A ce qui restaure la capacité d'interaction de Tau aux microtubules (Lu *et al.*, 1999). La phosphorylation de la Thr 231 semble donc jouer un rôle clé dans la régulation fonctionnelle de Tau.

1. 6. 2. Phosphorylation de Tau et transport axonal

Tau interfère avec le transport axonal de nombreuses molécules et organelles en modifiant la liaison des kinésines et dynéines avec les microtubules. Dans les cellules, la capacité d'interaction de Tau avec les kinésines est inhibée lorsque Tau est phosphorylée par GSK-3 β (Tatebayashi *et al.*, 2004). De plus, la surexpression de GSK-3 β dans des souris transgéniques exprimant de la Tau humaine augmente la phosphorylation de Tau et réduit l'axonopathie comparé aux souris exprimant uniquement la Tau humaine (Spittaels *et al.*, 2000). Ceci est probablement dû au fait que l'hyperphosphorylation induite par GSK-3 β diminue l'affinité de Tau pour les microtubules. Par conséquent, Les protéines Tau n'entrent plus en compétition avec les protéines motrices telles que les kinésines pour s'associer aux microtubules permettant à ces dernières de se lier davantage aux microtubules et ainsi de restaurer le transport antérograde.

1. 6. 3. Phosphorylation de Tau et développement

Durant le développement embryonnaire, la maturation des neurones est étroitement liée à l'état de phosphorylation de Tau. Dans le cerveau humain fœtal, les protéines Tau sont davantage phosphorylées que dans le cerveau adulte (Watanabe *et al.*, 1993). Ces protéines favorisent l'assemblage des microtubules moins efficacement que les protéines Tau provenant de cerveaux adultes (Yoshida and Ihara, 1993). Des taux élevés de Tau phosphorylées sont corrélés avec des périodes de fortes plasticités synaptiques dans le cerveau en développement (Brion *et al.*, 1994). La phosphorylation de Tau, en diminuant l'interaction de Tau aux microtubules durant ces périodes permettrait d'augmenter la flexibilité du cytosquelette nécessaire durant la migration neuronale, l'élongation axonale, la prolifération dendritique en particulier lors des premiers stades de développement.

Dans le cerveau adulte, l'apparition des isoformes Tau 4R et la diminution de la phosphorylation des protéines Tau avec l'âge notamment suite à une augmentation de l'activité des phosphatases (Mawal-Dewan *et al.*, 1994) corrèle avec une diminution de la plasticité neuronale et confère une rigidité et de ce fait une stabilité plus importante aux microtubules, nécessaires au maintien des connections établies.

1. 6. 4. Phosphorylation et localisation subcellulaire de Tau

La phosphorylation de Tau intervient dans la compartimentation des protéines Tau dans les neurones adultes et en développement. En effet, chez le rat adulte, les protéines Tau phosphorylées sont majoritairement localisées dans le compartiment somato-dendritique des neurones contrairement aux formes déphosphorylées observées dans les axones et les noyaux (Tashiro *et al.*, 1997). De plus, la phosphorylation de Tau, notamment aux sites Ser 195-205, entraîne une relocalisation de la protéine dans le compartiment somato-dendritique, tandis que Tau est principalement présente dans la région distale de l'axone lorsque cette région est déphosphorylée (Mandell and Banker, 1996).

La présence de Tau à la membrane plasmique dépend également de son état de phosphorylation. La phosphorylation de certains de ces sites comme la thréonine 231 entraîne son détachement de la membrane plasmique (Ekinici and Shea, 1999; Maas *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2008).

Concernant Tau nucléaire, peu de choses sont connues quant à son état de phosphorylation et l'implication de la phosphorylation dans sa localisation nucléaire. Les premières études mettant en évidence l'existence d'une forme nucléaire de la protéine la décrivait comme hautement insoluble puisque un prétraitement par de l'acide formique semblait nécessaire à l'extraction de la protéine. (Brady *et al.*, 1995; Loomis *et al.*, 1990). Cependant, les études réalisées par la suite indiquent que Tau, dans le noyau des cellules est, comme dans le cytosol, soluble.

En ce qui concerne son état de phosphorylation, une étude réalisée dans des cellules de neuroblastomes a montré que la phosphorylation de Tau est similaire entre les formes cytosoliques et nucléaires (Greenwood and Johnson, 1995). Cependant, dans la plupart des études, la détection de Tau dans le noyau des cellules s'est faite à l'aide de l'anticorps Tau1, un anticorps reconnaissant les protéines Tau lorsque celles-ci sont déphosphorylées sur les sites Ser 195/198/199/202 suggérant que les protéines sont au moins déphosphorylées sur ces résidus (Brady *et al.*, 1995; Loomis *et al.*, 1990; Thurston *et al.*, 1996).

De plus, en 2003, des travaux ont mis en évidence une relation entre phosphorylation, glycosylation et localisation subcellulaire de Tau. En effet, lorsque la protéine est fortement phosphorylée, le taux d'incorporation de résidus O-GlcNAc diminue. Cette hausse de la phosphorylation associée à la baisse de O-glycosylation est corrélée avec une modification de la localisation cellulaire de Tau et plus précisément à une baisse de la quantité de Tau dans le noyau des cellules ce qui laisse à penser que, les formes hyperphosphorylées de Tau ne vont pas dans le noyau (Lefebvre *et al.*, 2003b). D'autres études sont néanmoins nécessaires afin de pouvoir conclure de façon certaine sur l'état de phosphorylation de Tau dans le noyau et de l'implication de la phosphorylation dans la localisation et la fonction de Tau dans les neurones.

En conclusion, Tau est une protéine associée aux microtubules dont le rôle principal consiste à favoriser l'assemblage et la stabilisation des microtubules, fonctions essentielles pour la maintenance de la morphologie cellulaire, l'établissement de la polarité neuronale durant le développement et la régulation du transport axonal.

Cependant, de plus en plus d'études lui attribuent également d'autres fonctions en relation avec ses différentes localisations subcellulaires. En interagissant avec des éléments de la membrane plasmique, Tau semble ainsi intervenir dans la régulation de voies de signalisation.

Dans le noyau, Tau pourrait, en interagissant avec les molécules d'ADN, avoir un rôle stabilisateur voir exercer une fonction protectrice vis-à-vis de l'ADN.

Les fonctions physiologiques de Tau sont régulées par des modifications post-traductionnelles et en particulier par la phosphorylation. Une dérégulation de l'état de phosphorylation de Tau peut ainsi conduire à une perte de fonction de la protéine, et entraîner, a terme, à un dysfonctionnement neuronal important.

2. Implications physiopathologiques de Tau dans les maladies neurodégénératives

2. 1. Concept de Tauopathie

Les protéines Tau sont impliquées dans la physiopathologie de plus d'une vingtaine de maladies neurodégénératives, regroupées sous le terme de Tauopathies. Ces maladies sont caractérisées par une altération des protéines Tau conduisant à leur agrégation sous forme de filaments dans les neurones ou, dans d'autres types cellulaires tels que les astrocytes et oligodendrocytes (Kovacs *et al.*, 2008; Iwatsubo *et al.*, 1994; Nishimura *et al.*, 1992).

L'origine et les mécanismes conduisant à la formation de ces agrégats et à la neurodégénérescence sont mal connus. Les étiologies sont diverses et pas toujours identifiées. Certaines seraient dues à des facteurs environnementaux tandis que d'autres ont une origine génétique.

2. 1. 1. Tauopathies d'origine traumatique

Des états démentiels consécutifs à des traumatismes crâniens ont été à l'origine rapportés chez des boxeurs qui, après un certain nombre d'années, développaient des signes de démence. Ces démences sont aujourd'hui dénommées **démences pugilistiques** ou encéphalopathie traumatique des boxeurs (Tokuda *et al.*, 1991).

Ces démences sont provoquées par des traumatismes répétés de la tête et sont donc souvent retrouvés chez des personnes exerçant certains sports tels que la boxe. Sur le plan neuropathologique, on observe une atrophie du cervelet, la perte de neurones de Purkinje et des neurones pigmentés de la substance noire ainsi que la présence d'agrégats de Tau dans certaines zones du cerveau notamment dans l'isocortex et l'hippocampe (Areza-Fegyveres *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2001).

L'apparition d'agrégats de Tau a également été mise en évidence chez des enfants atteints **d'autisme présentant des comportements d'auto mutilation** et se donnant des coups répétés sur la tête. A l'autopsie, des inclusions sont détectées dans plusieurs régions du cerveau comme dans les couches II et III du cortex. Des agrégats sont également observés, de manière moins importante dans l'amygdale et le cortex orbito-frontal (Hof *et al.*, 1991a).

Par conséquent, la présence de traumatismes crâniens fréquents semble être suffisante pour provoquer l'apparition d'agrégats de Tau dans certaines régions spécifiques du cerveau entraînant divers troubles et conduisant à une démence.

2. 1. 2. Tauopathies d'origine infectieuse

Certaines Tauopathies ont une origine infectieuse. C'est le cas de la **Panencéphalite subaiguë sclérosante (PESS)**. La PESS est une encéphalopathie létale dont la cause est attribuée à une infection par le virus muté de la rougeole. Il s'agit essentiellement d'une maladie de l'enfant et de l'adolescent. (pour revue (Norrby and Kristensson, 1997; Patterson *et al.*, 2001; Yuksel *et al.*, 2010)). D'un point de vue neuropathologique, on note la présence d'une perte neuronale et d'agrégats de Tau qui n'est pas observée dans tous les cas étudiés, peut être à cause du très jeune âge de certains patients et de la rapidité de la survenue du décès chez ces personnes. Les agrégats sont distribués dans tout le cortex cérébral et mais touchent surtout les couches II, III et V du néocortex (Baner *et al.*, 1996).

Le syndrome parkinsonien post encéphalitique (PEP) est également une Tauopathie dont on pense que son origine est infectieuse. En effet, après la seconde guerre mondiale, l'encéphalite léthargique d'origine virale va toucher plusieurs millions de personnes à travers le monde et soudainement disparaître dans les années 1920. Cette maladie va tuer un tiers des personnes atteintes et mener à un syndrome parkinsonien post encéphalitique dans de nombreux cas.

Plusieurs études suggèrent donc que l'origine de la maladie serait virale et ferait intervenir une infection par un virus dont le plus souvent mis en cause est le virus de la grippe H1. Cependant aucune certitude sur l'origine de la survenue de ce syndrome n'est clairement établie (Mortimer, 2009).

Ainsi, ce syndrome apparaît fréquemment à la suite d'encéphalite léthargique. L'agrégation des protéines Tau conduit ici à une dégénérescence principalement au niveau de la substance noire. D'autres régions comme l'hippocampe le cortex enthorinal, les aires néocorticales et subcorticales sont également touchées mais à des taux plus variables (Buee-Scherrer *et al.*, 1996; Hof *et al.*, 1992). La PEP se caractérise par un syndrome parkinsonien, cependant, des corps de lewy ne sont pas observés (Jellinger, 2009).

2. 1. 3. Tauopathies d'origine toxique

Une Tauopathie appelée **Complexe Sclérose Latérale Amyotrophique/ Syndrome Parkinsonien de l'île de Guam** a été rapportée provoquée par une toxine alimentaire contenue dans les graines d'un palmier, *Cycas circinalis*.

En effet, l'île de Guam de l'archipel des Mariannes du pacifique Ouest compte de nombreux cas de syndromes parkinsoniens associés à des lésions de type Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et caractérisés par un syndrome démentiel, responsables du décès de nombreux adultes de la population Chamorro (Hirano *et al.*, 1961). L'association SLA-démence-parkinsonisme a aussi été retrouvée dans l'ouest de la nouvelle guinée, dans la péninsule de Kii au Japon et dans une partie des Philippines (Spencer *et al.*, 1987a et b).

La cause est inconnue, cependant des études épidémiologiques laissent soupçonner un facteur environnemental. Une modification des habitudes alimentaires pourrait être en cause. En effet, il a pu être montré que les populations indigènes de ces régions étaient en contact avec de nombreuses neurotoxines dont une famille a attiré l'attention des chercheurs : les cycas. Dans l'île de Guam cette toxine est contenue dans les graines de Cycad (faux palmier) utilisées dans l'alimentation. Des cataplasmes à bases d'écorces d'autres Cycad ont été utilisés dans l'ouest de la nouvelle guinée. Par ailleurs, chez le singe, l'induction d'une neurodégénérescence de même type que celle observée chez l'homme a été possible en les nourrissant avec la toxine du Cycad de guam, la BMAA (pour « beta-methylamino-L-alanine ») (Cox and Sacks, 2002; Spencer *et al.*, 1987a; pour revue (Steele and McGeer, 2008)).

Chez les patients atteints de cette maladie, l'analyse du cerveau a révélé la présence d'une atrophie corticale diffuse et sévère ainsi que l'abondance d'agrégats de Tau dans de nombreuses régions corticales en particulier dans les régions temporales du neocortex. Dans les aires isocorticales, les agrégats sont plus importants dans les couches II et III (Buée-Scherrer *et al.*, 1995 ; Hof *et al.*, 1991b).

Une origine toxique est également suspectée dans une autre Tauopathie relatée en Guadeloupe dénommée **parkinsonisme avec démence de Guadeloupe**. Cette pathologie présente des similitudes avec le Complexe Sclérose Latérale Amyotrophique/ Syndrome Parkinsonien de l'île de Guam et la paralysie supra nucléaire progressive (PSP). Elle est considérée comme étant un parkinsonisme atypique dont le syndrome démentiel ressemble à celui de la PSP. Ici, la cause pourrait être toxique impliquant une neurotoxine présente dans une plante, *Annona muricata* (Caparros-Lefebvre and Elbaz, 1999; Lannuzel *et al.*, 2007).

2. 1. 4. Tauopathies d'origine génétique

Certaines maladies neurodégénératives sont directement liées à la présence de mutations sur le gène codant pour Tau (MAPT). Ces maladies sont principalement les **démences fronto-temporales de type parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17)**.

Jusqu'à maintenant, plus d'une trentaine de mutations ont été décrites sur le gène codant pour Tau (Figure 7).

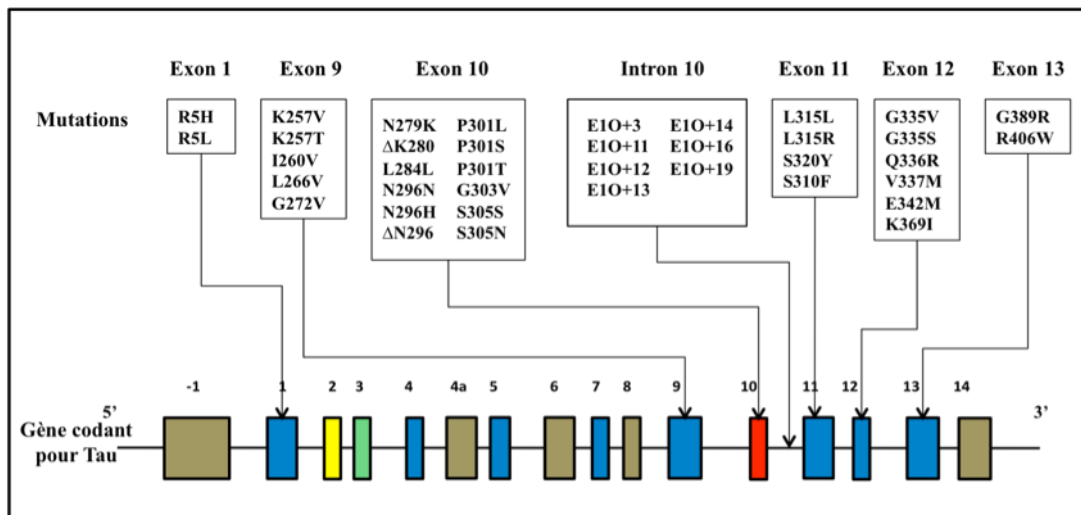


Figure 7: Mutations du gène codant pour Tau identifiées dans les DFTP-17. Adaptée selon (Brunden *et al.*, 2009).

Une classification peut être établie sur la base de leurs effets fonctionnels (pour revue (Wolfe, 2009)). On distingue:

- Les mutations modifiant l'interaction de Tau avec les microtubules. La majorité de ces mutations sont situées dans des régions codantes du gène, au sein du domaine de liaison aux microtubules ou à proximité immédiate.
- Les mutations qui changent l'épissage de l'exon 10 et donc modifient la proportion des isoformes 4R par rapport aux isoformes 3R. Ce sont souvent des mutations introniques proches du site d'épissage de l'exon 10 qui vont conduire à une augmentation de l'inclusion de l'exon 10 dans les isoformes de Tau.

Sur le plan neuropathologique, on observe une atrophie corticale fronto-temporale souvent accompagnée d'une atrophie de structures sous-corticales.

La perte neuronale est importante, essentiellement dans les couches corticales superficielles et dans la substance noire. Des inclusions positives pour Tau sont observées, selon les familles,

soit exclusivement dans les neurones, soit dans les neurones et dans les cellules gliales du néocortex et de certaines structures sous-corticales.

La nature des mutations et le retentissement fonctionnel de ces mutations ne semblent cependant pas liés à une présentation clinique ou à des lésions anatomopathologiques particulières.

Une implication génétique a également été suggérée dans d'autres Tauopathies notamment la **paralysie supranucléaire progressive (PSP) et la dégénérescence cortico basale (DCB)** ou une association a été décrite entre des haplotypes de Tau. En effet, il a été montré que l'haplotype H1 de Tau et génotype (H1/H1) est présent chez 95% des personnes atteintes de PSP contre 57% dans la population générale. Cet haplotype est constamment associé avec une augmentation du risque de développer une PSP au contraire de l'haplotype H2 qui semble être protecteur. De plus, l'haplotype H1 conduit à une augmentation des isoformes 4R de Tau créant un déséquilibre entre les isoformes 3R et 4R. Cette association a également été décrite dans la DCB (Pittman *et al.*, 2005).

Une origine génétique plus indirecte a été mise en évidence dans la **dystrophie myotonique de type 1 et 2 (DM1 et DM2)**. La DM1 est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Elle est due à une expansion pathologique de triplets CTG au sein de la région 3'UTR du gène DMPK (pour le terme anglais « Dystrophy Myotonic Protein Kinase ») situé sur le chromosome 19 et codant la myotonine, une Protéine Kinase cAMP dépendante dont le rôle précis est inconnu (Brook *et al.*, 1992).

L'étiologie de la DM1 repose sur un gain de fonction toxique des ARN transcrits à partir de ce gène muté. Ces ARN contiennent une longue expansion de CUG et sont retenus dans le noyau des cellules ou ils s'associent avec des protéines comme MBNL1 (pour le terme anglais « muscleblind-like protein 1»), un facteur de régulation de l'épissage. Dans le cerveau de patients atteints de DM1, un défaut d'épissage alternatif du transcrit de Tau a ainsi été observé et conduit à la surexpression de l'isoforme foetale avec notamment, une exclusion préférentielle des exons 2 et 3 (Sergeant *et al.*, 2001). Ce défaut s'accompagne d'une agrégation des protéines dépourvues des séquences codées par les exons 2 et 3.

La présence d'agrégats de Tau est également retrouvée dans le cerveau de patients atteints de DM2 dont l'origine est une mutation sur le premier intron du gène ZNF9 (Ranum *et al.*, 1998).

Des agrégats de Tau sont également observés dans les cerveaux des patients atteints du **syndrome de Down**, chez lesquels le chromosome 21 est présent en 3 exemplaires suggérant

que, ici, l'apparition de la pathologie Tau est d'origine génétique (Mann and Esiri, 1989; Motte and Williams, 1989).

2. 1. 5. Tauopathies la plus fréquente : la maladie d'Alzheimer

En novembre 1906, lors du « 37th meeting of South-West German psychiatrists » à Tubingue, le neuropsychiatre allemand Alois Alzheimer décrit pour la première fois une nouvelle forme de démence, données qu'il publiera peu de temps après sous le titre de « A characteristic serious disease of the cerebral cortex », puis de façon plus complète en 1911. Il y présente le cas d'une patiente appelée Auguste D



Figure 8 : Photographie de Auguste D prise en 1902.

(Figure 8) admise dans son service 5 ans auparavant et présentant des troubles importants du comportement, notamment des hallucinations auditives, une paranoïa, des troubles de l'orientation, une perte de la mémoire ainsi que les signes d'une démence.

L'observation microscopique des coupes de son cerveau révèle la présence d'une perte neuronale accompagnée d'une gliose ainsi que la présence de deux lésions au sein de son cortex cérébral : les dégénérescences neurofibrillaires et les dépôts amyloïdes (Graeber and Mehraein, 1999). Cette démence se nomme maladie d'Alzheimer (MA) du nom du neuropsychiatre considéré comme à l'origine de sa découverte.

2. 1. 5. 1. Epidémiologie et étiologie de la maladie d'Alzheimer

La MA est à l'heure actuelle la première cause de démence dégénérative. Plus de 24 millions de personnes à travers le monde sont atteintes de démences dont la majorité est due à la MA. On estime que le nombre de personnes affectées pourrait doubler tous les 20 ans et atteindre plus de 80 millions en 2040 (Ferri *et al.*, 2005). Le nombre important de personnes concernées associé à la lourde prise en charge des patients atteints fait de cette maladie un problème majeur de santé publique.

Le plus souvent, la MA apparaît de façon sporadique. Néanmoins, il existe des formes familiales rares qui représentent moins de 1% des cas et pour lesquelles la maladie se déclare plus tôt avec la présence de mutations autosomiques dominantes sur les gènes codant pour des

protéines impliquées dans la physiopathologie de la maladie. En 1991, la première mutation responsable de la maladie d'Alzheimer de type familiale, est découverte, localisée sur le gène de l'APP (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Goate *et al.*, 1991; Murrell *et al.*, 1991). D'autres mutations ont, par la suite, été identifiées sur ce même gène ainsi que sur les gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), des protéines impliquées dans le métabolisme de l'APP (Mullan *et al.*, 1992).

D'autres gènes influencent le déroulement de la maladie, ce sont les facteurs de susceptibilité génétiques. C'est le cas du gène codant pour la protéine apolipoprotéine E (APOE). Il existe 3 allèles de ce gène ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$). L'allèle $\epsilon 4$ est fortement augmentée chez les sujets atteints de MA faisant de cet allèle un facteur de risque de développer la maladie (Corder *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993). Ces mutations déterminent une forme de la maladie plus précoce (entre 30 et 55 ans). Cependant le tableau neuropathologique est similaire à celui observé dans les cas de MA sporadique suggérant que les mécanismes à l'origine de la maladie sont communs. De nombreux autres facteurs de susceptibilité génétique ont été identifiés comme les variants des gènes de la clusterine (CLU) et le gène du récepteur 1 du composant 3b/4b du complément (CR1) (Lambert *et al.*, 2009). Cependant, pour la plupart de ces gènes, l'implication reste moindre par rapport au gène de l'APOE (pour revue (Seripa *et al.*, 2009)). Bien que l'étiologie de la MA de type non familiale n'est pas connue, il existe plusieurs facteurs associés à un risque plus élevé de développer la maladie dont le principal est l'âge. On trouve également les traumatismes crâniens, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies cardiovasculaires, ou encore le diabète (Kroner, 2009; pour revue (Rocchi *et al.*, 2009); Salib and Hillier, 1997).

2. 1. 5. 2. Descriptif clinique et neuropathologique

La MA se caractérise par une altération lente et progressive des fonctions intellectuelles provoquant des troubles majeurs de la personnalité et de l'adaptation sociale. Dans les stades précoces, elle affecte principalement la mémoire dite à court terme puis des troubles plus importants apparaissent notamment l'altération du langage (aphasie), la perturbation des gestes élaborés, des troubles comportementaux (des troubles de l'humeur, paranoïa) avec, pour finir, l'apparition de la démence dans les stades tardifs.

Sur le plan neuropathologique, on observe une atrophie du tissu cérébral. Elle est souvent marquée et diffuse (Fox *et al.*, 1996) et concerne essentiellement les régions temporales internes et hippocampiques, puis plus tardivement les régions temporo-occipitales.

Elle prédomine dans les zones où la pathologie Tau est fortement présente (Whitwell *et al.*, 2008). L'atrophie s'accompagne d'une dilatation symétrique des ventricules cérébraux et des sillons corticaux visibles *in vivo* par imagerie à résonance magnétique (IRM) et scanner. Elle traduit une perte synaptique et/ou neuronale massive sur l'ensemble des régions corticales en particulier dans le cortex entorhinal et l'hippocampe (Gomez-Isla *et al.*, 1996; West *et al.*, 1994).

L'examen du tissu cérébral des patients atteints de MA révèle la présence d'une gliose astrocytaire ainsi que l'installation progressive, et à l'heure actuelle irréversible, de deux types de lésions dans l'ensemble du cortex cérébral.

➤ Les dépôts amyloïdes

Ce sont des lésions extracellulaires formées par le dépôt d'un peptide appelé β -amyloïde. Ces dépôts, lorsqu'ils sont entourés de neurites en dégénérescence riches en protéines Tau forment **les plaques séniles** (Figure 9) (Duyckaerts *et al.*, 2009).

Il est très difficile d'établir une cinétique d'apparition des dépôts amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer. Ces dépôts envahissent la quasi-totalité du cortex cérébral. La substance amyloïde s'infiltré également, à des taux variables, dans la paroi de certains vaisseaux, constituant l'angiopathie amyloïde.

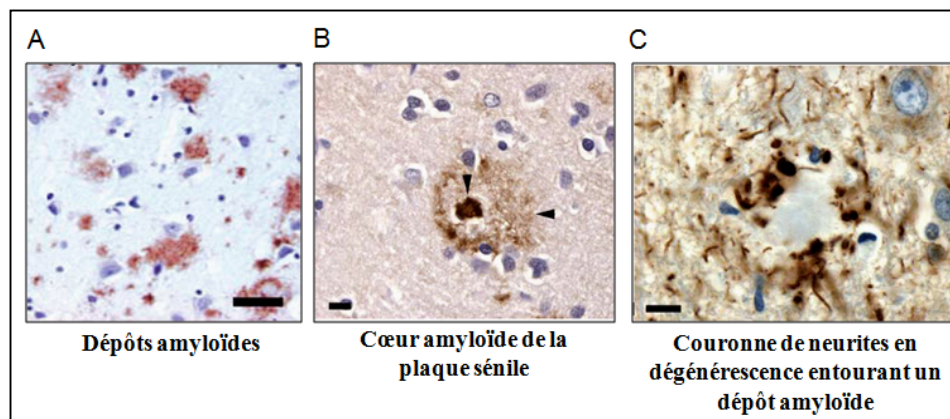


Figure 9 : Dépôts amyloïdes et plaques séniles. A. Dépôts amyloïdes observés par immuno-histochimie à l'aide d'un anticorps anti Abeta (Alafuzoff *et al.*, 2009) B. dépôt dense de substance amyloïde au cœur d'une plaque sénile visualisée après immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti Abeta C. Enchevêtrement de neurites en dégénérescence Tau-positif autour d'une plaque sénile visualisée par un anticorps anti-Tau (Duyckaerts *et al.*, 2009).

À l'échelle microscopique, la substance amyloïde se présente sous la forme de filaments extracellulaires compacts de 6 à 10 nm de diamètre (Castano *et al.*, 1986). Ces filaments sont constitués d'un polypeptide de 39 à 43 AA, appelé peptide β -amyloïde ou $A\beta$, principal

constituant des plaques. Le clonage du gène de ce peptide a montré qu'il provient d'une protéine transmembranaire de plus au poids moléculaire : le précurseur du peptide amyloïde ou APP (pour le terme anglais « amyloid precursor protein ») (Glenner and Wong, 1984; Wong *et al.*, 1985).

En effet, l'APP subit au niveau des membranes neuronales des coupures protéolytiques séquentielles par des enzymes qui, en fonction des enzymes impliquées, vont donner naissance à différents peptides dont le peptide amyloïde, on parle alors de voie amyloïdogénique (Figure 10) (Pour revue (Ling *et al.*, 2003)).

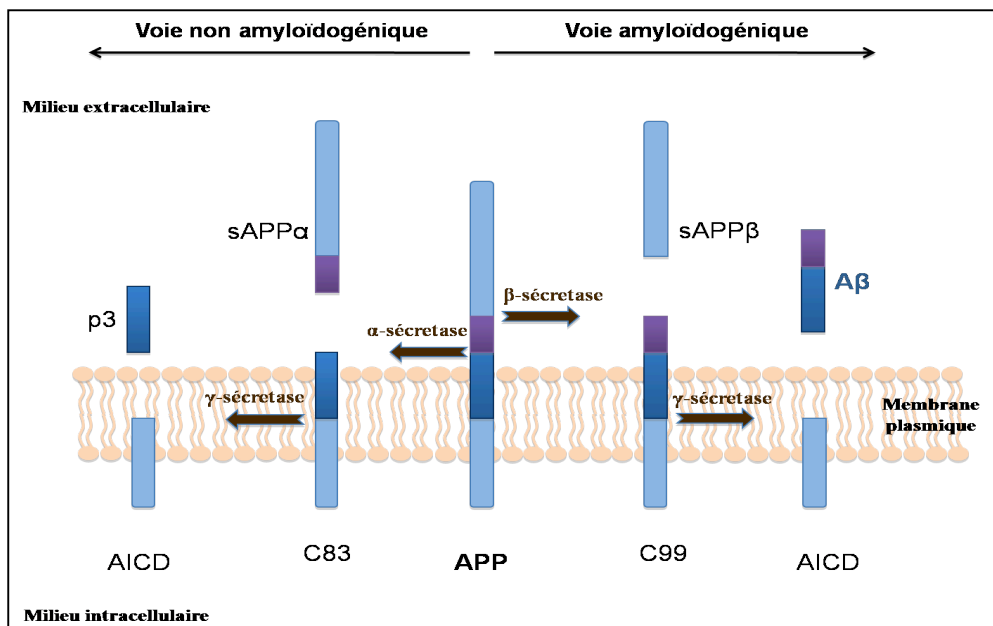


Figure 10 : Les voies de métabolisme de l'APP. Lorsque le premier clivage est réalisé par l' α -sécrétase, deux peptides sont obtenus, l'sAPP α et le peptide C83. Ce dernier est ensuite clivé par la γ -sécrétase donnant naissance à deux autres peptides : l'AICD et P3. Il s'agit de la voie non amyloïdogénique. Lorsque le premier clivage de l'APP est opéré par la β -sécrétase, les peptides sAPP β et C99 sont libérés. Le peptide C99 est alors clivé par l'enzyme γ -sécrétase, libérant le peptide AICD et le peptide A β , c'est la voie amyloïdogénique.

➤ Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF):

Les DNF correspondent à l'accumulation intraneuronale de masses plus ou moins fibrillaires formées de structures caractéristiques, les paires de filaments appariés en hélice (PHF, pour le terme anglais « paired helical filament »).

Leur caractère argyrophile, permet de les visualiser par des techniques d'imprégnations argentiques telles que la technique du Gallyas ou Bielchowski (Terry *et al.*, 1964), utilisée par

Aloïs Alzheimer lors de sa description des lésions (Graeber and Mehraein, 1999). Les PHF s'accumulent dans les corps cellulaires et les prolongements neuritiques des neurones ainsi qu'à la périphérie des plaques amyloïdes (Kidd, 1963; Terry, 1963; Terry *et al.*, 1964).

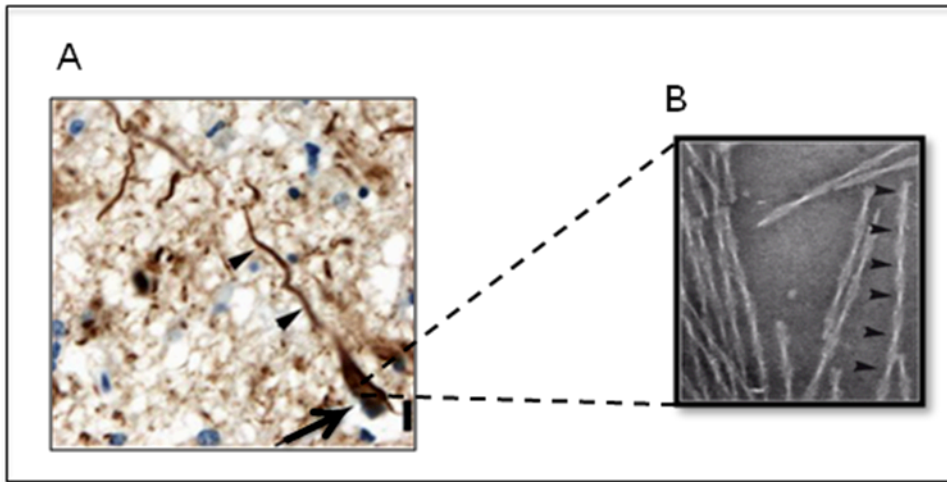


Figure 11: Dégénérescences neurofibrillaires observées dans la MA. A. Neurone en DNF par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-pTau (AT8) (Duyckaerts *et al.* 2009). B. Observation par microscopie électronique de PHF purifiés à partir d'extraits cérébraux de patients atteints de MA.

La caractérisation histologique des DNF montre que les PHF résultent de l'agrégation intraneuronale des protéines microtubulaires Tau, composants majeurs des agrégats (Brion *et al.*, 1985; Grundke-Ikbal *et al.*, 1986a, Kosik *et al.*, 1986).

Les DNF sont présentes chez toutes les personnes âgées de plus de 50 ans. Cependant, leur accumulation est moins intense que celle observée dans la MA, et se limite à la région hippocampique.

Dans le cerveau des patients malades, les inclusions de Tau envahissent le tissu cérébral de manière hiérarchisée, séquentielle et prédictible commençant dans la région hippocampique, puis dans le cortex temporal, les régions associatives, atteignant dans les stades tardifs l'ensemble du cortex.

Cette propagation de la DNF est fortement corrélée avec l'évolution des signes cliniques (Braak and Braak, 1991; Delacourte *et al.*, 1999) et la sévérité de la maladie (Arriagada *et al.*, 1992). En 1991, une première classification, établie sur des critères morphologiques a permis de définir 6 stades d'évolution de la pathologie (Braak and Braak, 1991, Braak and Braak, 1997). Ainsi, la DNF envahit dans un premier temps le cortex trans-entorhinal et entorhinal (stades I et II), puis l'hippocampe (stades II et IV) avec pour finir une atteinte néocorticale

(stades V et VI). Une caractérisation plus fine de la propagation des lésions et des signes cliniques associés a, par la suite, permis de distinguer 10 stades correspondant aux différentes régions cérébrales successivement affectées au cours de la MA et de distinguer 3 groupes (Delacourte *et al.*, 1999) (Figure 12):

- Le vieillissement normal (stades S0 à S3) avec une atteinte de la région entorhinale pour les individus âgés de plus de 50 ans.
- Une phase asymptotique ou pré-clinique (du stade S4 à S6). En effet, la DNF s'installe dans plusieurs régions cérébrales sans pour autant qu'il y ait de manifestations cliniques évidentes.
- Une phase clinique (stades S7 à S10) qui correspond à la présence de la DNF dans de nombreuses régions corticales (aires associatives polymodales, aires corticales primaires, visuelles et motrices).

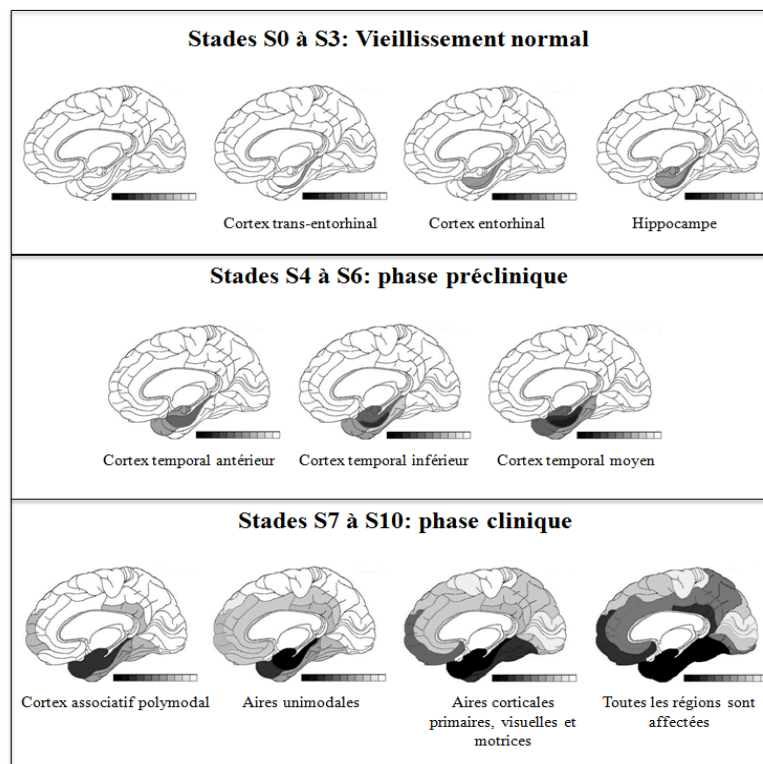


Figure 12 : Progression cérébrale de la DNF aux cours de la MA.
Adaptée selon (Delacourte *et al.*, 1999).

En conclusion, chaque Tauopathie se définit par une combinaison de spécificités cliniques, neuropathologiques, biochimiques et génétiques. Chaque condition pathologique a sa propre distribution laminaire et régionale des lésions. Bien que ces pathologies aient des causes diverses et soient définies par des tableaux cliniques et neuropathologiques différents, elles partagent certaines caractéristiques : leur évolution

est progressive, Elles sont caractérisées par le dépôt intracellulaire d'agrégats constitués de protéines Tau dans le système nerveux central conduisant à une neurodégénérescence ainsi qu'à la mort de certaines sous populations neuronales. Ces lésions entraînent l'apparition de nombreux troubles cognitifs et /ou moteurs aboutissant dans de nombreux cas à une démence.

2. 2. Mécanismes d'agrégation de Tau

2. 2. 1. Agrégats de Tau

2. 2. 1. 1. Structure des agrégats

Sur le plan histopathologique, la forme, l'organisation et la localisation des inclusions de Tau diffèrent suivant les Tauopathies.

Dans la MA, les inclusions sont principalement neuronales au contraire de la PSP et la DCB où les agrégats sont également retrouvés dans les astrocytes et oligodendrocytes (Armstrong *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002).

Ces agrégats prennent différents aspects tels que les dégénérescences neurofibrillaires et les fibres tortueuses retrouvées notamment dans les neurones de la MA et la démence Pugilistique (Schmidt *et al.*, 2001), des corps de Pick observés dans la maladie de Pick (Murayama *et al.*, 1990), les touffes gliales situées dans les corps cellulaires et prolongements des astrocytes et observés dans la PSP ou encore des plaques astrocytaires spécifiques de la DCB (Feany and Dickson, 1995). Dans les oligodendrocytes, les agrégats prennent la forme de « corps bobinés », on les retrouve notamment dans la DCB, la PSP, certaines DFTP-17 (Figure 13).

L'ultrastructure des inclusions varie également. Ainsi, certaines sont constituées de paires de filaments appariés en hélice, c'est le cas des dégénérescences neurofibrillaires de la MA, de filaments droits ou torsadés retrouvés par exemple dans la PSP mais également dans plusieurs autres Tauopathies (Montpetit *et al.*, 1985; Takahashi *et al.*, 2002).

La localisation, la forme et la structure des inclusions sont donc très variables et peuvent permettre de différencier certaines Tauopathies.

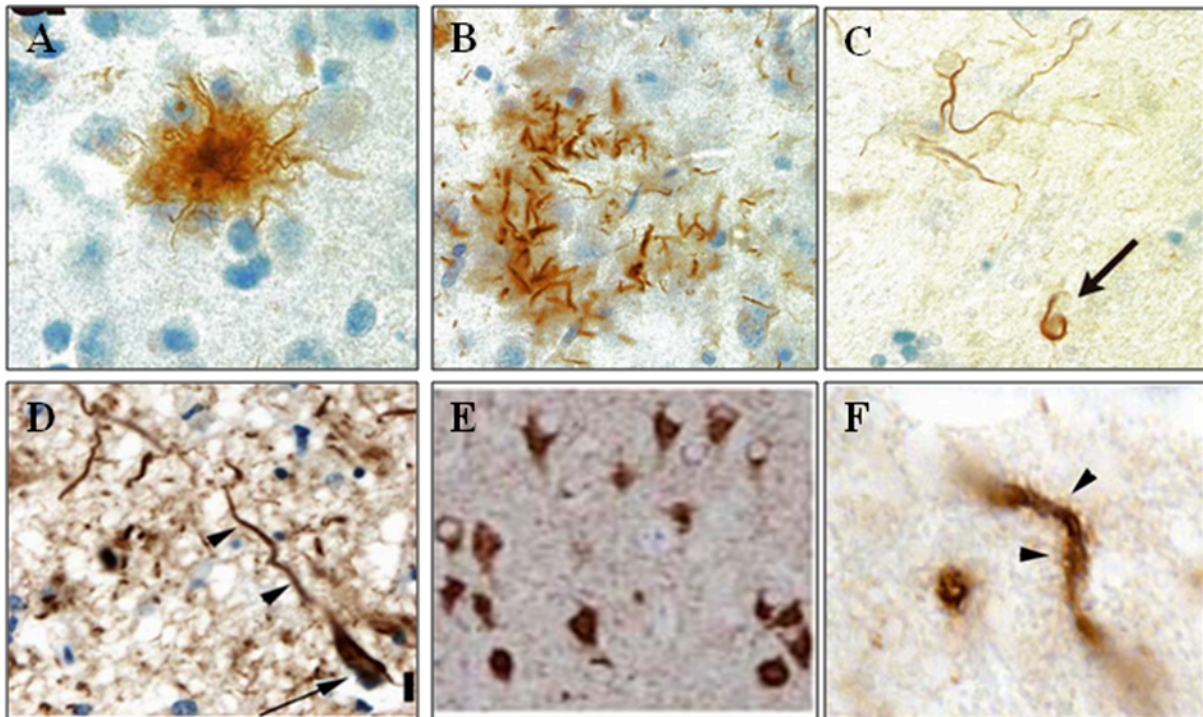


Figure 13: Différentes lésions observées dans les Tauopathies. A. Touffe gliale observée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-Tau (Tau 46.1) (Berry *et al.*, 2006) B. Plaque astrocytaire visualisée à l'aide d'un anticorps anti-Tau (AD2) (Berry *et al.*, 2006) C. Corps bobinés observés dans les oligodendrocytes avec un anticorps anti-Tau (Tau 46.1) (Berry *et al.*, 2006) D. Neurone en DNF marqué à l'aide d'un anticorps anti-pTau (AT8) (Duyckaerts *et al.*, 2009). E. Corps de Pick mis en évidence par un anticorps anti-Tau (AT8) (Eersel *et al.*, 2009) F. fibre tortueuse visualisée à l'aide d'un anticorps anti-Tau (Dako) (Duyckaerts *et al.*, 2009).

2. 2. 1. 2. Composition des agrégats

Les agrégats sont principalement constitués des protéines Tau anormalement et hyperphosphorylées (Grundke-Ikbal *et al.*, 1986b; Khatoon *et al.*, 1994; Kopke *et al.*, 1993). La représentation en isoformes et l'état de phosphorylation des protéines Tau pathologiques agrégées diffèrent suivant les Tauopathies. Ces différences permettent d'obtenir des profils biochimiques caractéristiques ce qui permet de les regrouper en une sorte de « code barre » des Tauopathies. On peut ainsi différencier 4 classes de Tauopathies en fonction des profils électrophorétiques obtenus à partir d'agrégats de Tau (Figure 14).

- **La classe 1** se définit par la présence de 3 bandes majeures à 60, 64 et 69 kDa et une bande mineure à 72/74 kDa. Ces bandes incluent les 6 isoformes de Tau. (Goedert *et al.*, 1992; Sergeant *et al.*, 1997b). La bande à 60 kDa correspond à l'isoforme fœtale et les bandes à 64

et 69 kDa aux isoformes 2+3+10- ; 2+3-10+, 2-3-10+ et 2+3-10-. La bande mineure à 72/74 kDa est constitué de l'isoforme la plus longue de Tau soit l'isoforme 2+3+10+ (Sergeant *et al.*, 1997a). La majorité des Tauopathies appartiennent à cette classe, on y retrouve notamment la maladie d'Alzheimer.

- **La classe 2** rassemble les Tauopathies dont le profil électrophorétique est défini par un doublet à 64 et 69 kDa. Elle se caractérise par une augmentation du ratio des isoformes de Tau 4R/3R dans les agrégats de Tau. Dans ce groupe, on retrouve la PSP, la DCB, la démence à grains argyrophiles (Flament *et al.*, 1991; Sergeant *et al.*, 1999 ; Ksiezak-Reding *et al.*, 1994).
- **La classe 3** est caractérisée par deux bandes majeures à 60 et 64 kDa correspondant essentiellement aux isoformes 3R. La maladie de Pick est la principale Tauopathie appartenant à ce groupe (Delacourte *et al.*, 1996 ; Sergeant *et al.*, 1997b).
- **La classe 4** est représentée par une seule maladie neurodégénérative, la dystrophie myotonique (Sergeant *et al.*, 2001 ; Udd *et al.*, 2003). Le profil biochimique des protéines Tau pathologiques se caractérise par une bande majeure à 60 kDa, bien que des bandes mineures à 64 et 69 kDa peuvent être observées. Ce profil reflète une réduction de l'expression des isoformes contenant les inserts codés par les exons 2 et 3. Les isoformes dépourvues des séquences codées par les exons 2 et 3 sont les principales isoformes retrouvées dans les inclusions (Sergeant *et al.*, 2001).

Les démences frontotemporales avec parkinsonisme liées au chromosomes 17 (DFTP-17) sont des formes familiales de Tauopathies causées par des mutations du gène codant pour Tau (Grover *et al.*, 1999; Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998). Ces démences peuvent appartenir à la classe 1, 2 ou 3 en fonction des caractéristiques des agrégats de Tau (Figure 14).

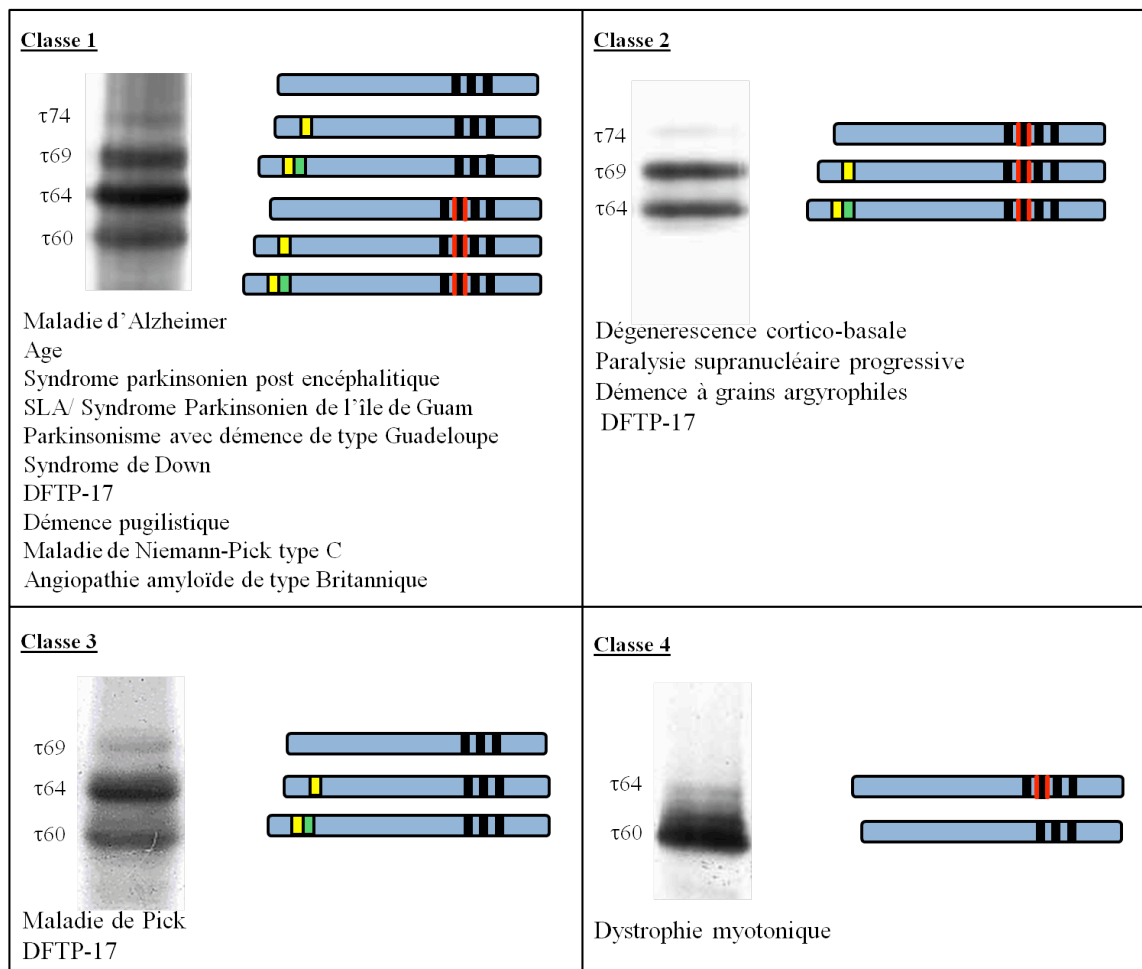


Figure 14: « Code barre » des tauopathies. Représentation schématique des différents profils électrophorétiques observés au sein des tauopathies. Adaptée selon (Sergeant *et al.*, 2008).

2. 2. 1. 3. Mécanismes d'agrégation : implication de la phosphorylation de Tau

L'origine de l'agrégation des protéines Tau n'est pas clairement définie. Les protéines Tau sont hautement solubles. Néanmoins, certaines séquences ont un caractère agrégatif comme la séquence correspondant au 3ème domaine de liaison aux microtubules (Pérez *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 1996). Elles sont de ce fait capables de s'agréger de façon spontanée en solution (Crowther *et al.*, 1994).

Les mécanismes de l'agrégation de Tau sont essentiellement décrits par des études *in vitro*. Ainsi, une des hypothèses concernant l'origine des agrégats est que, suite à plusieurs modifications, principalement une phosphorylation anormale et/ou des coupures protéolytiques (Garcia-Sierra *et al.*, 2008; Horowitz *et al.*, 2004) les protéines vont se détacher des microtubules, changer de conformation et s'assembler formant dans un premier temps des

dimères, puis des oligomères, avec pour finir la formation d'agrégats insolubles (Kuret *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2006). Par ailleurs, des études récentes réalisées *in situ* ou *in vivo* ont montré que les agrégats de Tau sont capables de se propager de cellules en cellules (Clavaguera *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2009). En effet, dans des souris transgéniques exprimant de la Tau humaine non mutée, l'injection d'agrégats de Tau provenant d'extraits de cerveaux de souris transgéniques exprimant la protéine Tau mutée P301L, induit l'agrégation de la Tau humaine non mutée en filaments et leur propagation du site d'injection aux régions voisines (Clavaguera *et al.*, 2009).

Dans les Tauopathies, des études biochimiques ont permis de mettre en évidence une altération de la phosphorylation de Tau dans les agrégats. En effet, dans la MA, une étude réalisée en 1986 a montré que le marquage Tau dans les PHF augmentait fortement après traitement par une phosphatase alcaline suggérant que les protéines Tau localisées dans les agrégats sont hyperphosphorylées (Grundke-Ikbal *et al.*, 1986b). Tau est normalement phosphorylée à raison de 2 ou 3 groupements phosphate par molécule contre 3 à 4 fois plus dans les cerveaux MA (Kopke *et al.*, 1993) allant jusqu'à 8 fois plus pour certaines études (Khatoon *et al.*, 1994).

Les protéines isolées à partir d'agrégats de Tau sont hyperphosphorylées mais également anormalement phosphorylées. Les sites anormalement phosphorylés sont dits « pathologiques ». Deux types de sites sont observés : soit les sites sont phosphorylés uniquement sur les protéines Tau agrégées soit la phosphorylation du site existe sur les protéines Tau normales mais dans le cas des protéines pathologiques, elle est anormale et induit des modifications de conformation de la protéine, on parle alors d'épitopes « conformationnels ». Ces sites sont visualisables par certains anticorps comme AT100 (Thr 212/Ser214), TG3 (Thr 231/Ser235), AP422 (Ser422), PH-27(pThr231/pSer237) (Hasegawa *et al.*, 1996; Hoffmann *et al.*, 1997; Jicha *et al.*, 1997b; Maillot *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 1996) (Figure 13). De plus, certains anticorps tels que Alz 50 et MC1 sont conformation-dépendant et ne reconnaissent les protéines que lorsqu'elles adoptent une certaine conformation (Jicha *et al.*, 1997a). Ainsi, la phosphorylation anormale de Tau entraînerait un changement de conformation des protéines favorisant leur fibrillogénèse (Daly *et al.*, 2000).

La phosphorylation pathologique de Tau est une caractéristique commune entre les Tauopathies. Néanmoins, les sites phosphorylés ne sont pas tous identiques. Par exemple, la phosphorylation des sites Ser 262/Ser356 est observée dans de nombreuses maladies comme la MA et les DFTP-17 mais est absente dans les inclusions de la maladie de Pick (Probst *et al.*, 1996).

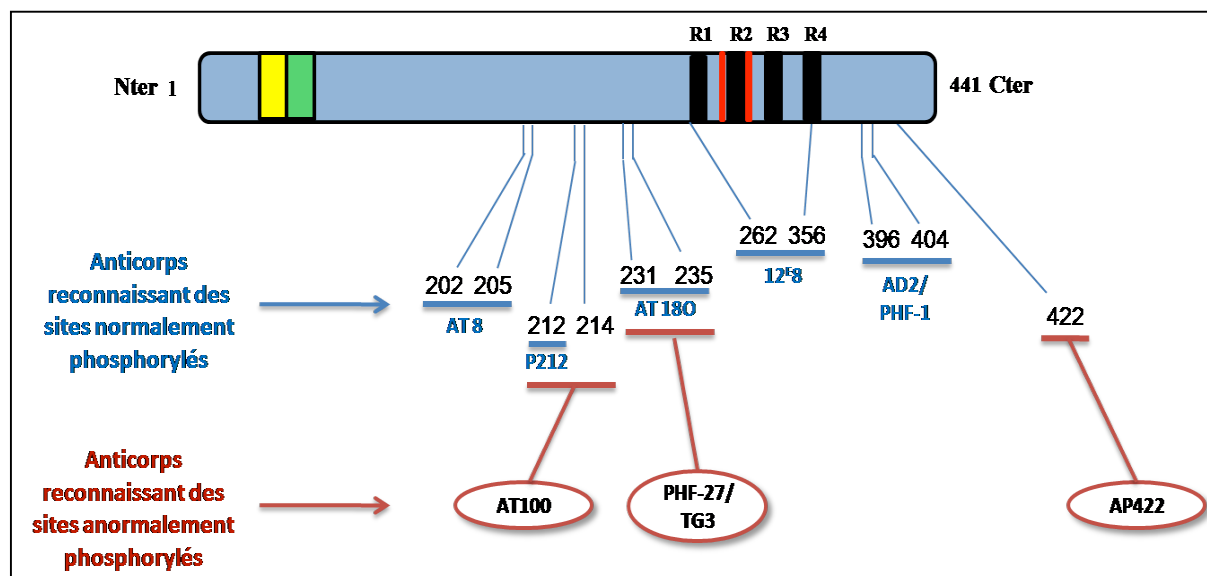


Figure 15 : Phosphorylation physiologique et pathologique de Tau. Certains sites sont phosphorylés sur les protéines Tau normales et visualisés par les anticorps représentés ici en bleu. D'autres sont dits « pathologiques » car anormalement phosphorylés ou uniquement phosphorylés sur les protéines Tau agrégées. Ces sites sont détectés par certains anticorps spécifiques représentés ici en rouge. Adaptée selon (Buée and delacourte, 2002).

La phosphorylation pathologique de Tau apparaît donc jouer un rôle primordial dans les processus d'agrégation. En effet, la déphosphorylation des protéines hyperphosphorylées solubles provenant de cerveaux MA par la phosphatase PP2A inhibe leur polymérisation en PHF tandis que la phosphorylation des protéines par une combinaison de kinases favorise la formation de PHF similaires à ceux observés dans les cerveaux de malades (Wang *et al.*, 2007). De plus, la déphosphorylation des PHF par PP2A et PP2B restaure les fonctions biologiques de Tau (Wang *et al.*, 1995). Ces résultats soulignent l'importance de l'hyperphosphorylation de Tau dans les mécanismes conduisant à l'agrégation des protéines.

De nombreuses kinases ont été impliquées dans la phosphorylation des protéines Tau issues des agrégats. Parmi les plus communes, on retrouve Cdk5, GSK3 β , CamKII et pKA. Des travaux suggèrent que l'action synergique de plusieurs kinases est nécessaire pour convertir Tau en protéine pathologique (Liu *et al.*, 2006).

D'autre part, l'hyperphosphorylation de Tau pourrait résulter d'une part de l'augmentation de l'activation de kinases mais également d'une diminution de l'activité des phosphatases (Gong *et al.*, 1995; Ladner *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2005). En effet, dans les cerveaux de patients atteints de MA, les ARNm de PP2A et PP1 sont diminués (Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2001). L'expression et l'activité de certaines phosphatases comme PP2A sont aussi plus faibles dans

certaines régions du cerveau affectées par les lésions (Sontag *et al.*, 2004). De plus, une augmentation de l'activité d'inhibiteurs de PP2A a aussi été observée dans le cerveau de patients atteints de MA (Tanimukai *et al.*, 2005).

2. 2. 1. 4. *Autres facteurs potentiellement impliqués dans les processus d'agrégation*

D'autres modifications sont détectées dans les agrégats dont des coupures protéolytiques sur les sites Glu391 et Asp421 conduisant à la formation de Tau tronquées notamment détectées dans les inclusions de la MA, la maladie de Pick, la PSP et la CBD (Blennow and Vanmechelen, 1998; Guillozet-Bongaarts *et al.*, 2007; Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2008; Zilka *et al.*, 2006). Ces coupures induisent des changements conformationnels des protéines Tau (Corsellis *et al.*, 1973; Cummings and Benson, 1984) et favorisent leur détachement des microtubules. (Basurto-Islas *et al.*, 2008; Luna-Muñoz *et al.*, 2007). De plus, *in vitro*, elles accélèrent l'assemblage de protéines Tau sous forme de filaments (Yin and Kuret, 2006; Zilka *et al.*, 2006) suggérant une implication de cette modification dans le processus d'agrégation.

Une augmentation de plusieurs modifications post-traductionnelles comme la nitration, l'ubiquitinylation, la N-glycosylation et la glycation ont également été observées sur les protéines Tau et pourraient favoriser l'apparition des filaments (Riederer *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 1999). D'autre part, les protéines non phosphorylées sont capables de s'agréger en présence de facteurs divers comme les glycosaminoglycanes, l'aluminium ou des polyanions tels que les lipides et ARN (Arrasate *et al.*, 1997; Ginsberg *et al.*, 1997; Goedert *et al.*, 1996; Kampers *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1993; Wilson and Binder, 1997).

Par conséquent, Tau fait l'objet de nombreuses modifications dont la principale est une dérégulation de la phosphorylation de la protéine. De nombreux facteurs sont probablement impliqués dans l'altération pathologique de Tau et la formation de filaments qui conduisent à terme à des perturbations importantes des fonctions cellulaires.

2. 2. 2. Conséquences fonctionnelles des modifications pathologiques de Tau et de la formation d'agrégats

La phosphorylation pathologique de Tau est responsable de son détachement des microtubules et de ce fait de la déstabilisation du réseau microtubulaire (Alonso *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007). Les fonctions vitales nécessaires au bon fonctionnement des neurones, comme le transport axonal, la croissance neuritique et la transmission synaptique sont alors fortement perturbées. Ces déficits sont souvent observés précocement dans les Tauopathies (Stokin *et al.*, 2005). Par exemple, dans la MA, les dommages synaptiques sont des évènements précoces et la perte synaptique corrèle bien avec les déficits cognitif même davantage qu'avec la DNF (Davies *et al.*, 1987; DeKosky and Scheff, 1990; Terry *et al.*, 1991). De plus, dans des modèles cellulaires, l'hyperphosphorylation de Tau suite à l'inhibition des phosphatases bloque le trafic intracellulaire, et la croissance axonale des neurones et entraîne l'apparition de caractéristiques de neurodégénérescence (Yang *et al.*, 2007).

Cependant, la phosphorylation de Tau peut avoir un rôle protecteur dans certaines conditions. Certains travaux ont en effet montré un effet anti-apoptotique des protéines Tau hyperphosphorylées *in situ* (Li *et al.*, 2007). De plus, dans un modèle d'hibernation, on observe une augmentation de la phosphorylation de Tau dans l'hippocampe et le cortex corrélée à une diminution du nombre de synapses suggérant un mécanisme physiologique de neuroprotection dans ces conditions (Arendt *et al.*, 2003). Au cours du développement, les taux élevés de Tau phosphorylées sont observés et corrèlent avec des périodes de forte plasticité synaptique dans le cerveau nécessaire au développement (Brion *et al.*, 1994).

Les formes toxiques de Tau responsables de l'apparition de ces altérations ne sont donc pas clairement définies. Dans de nombreux modèles de Tauopathies, les déficits, que ce soit cognitifs ou synaptiques sont détectés avant l'apparition des agrégats (Le Corre *et al.*, 2006; Oddo *et al.*, 2006; Santacruz *et al.*, 2005; Yoshiyama *et al.*, 2007). Ainsi, dans un modèle de drosophiles transgéniques mutées sur le gène codant pour Tau, il a été observé l'apparition progressive d'une dégénérescence sans formation d'agrégats suggérant que certaines formes de Tau non fibrillaires peuvent être toxiques et que la présence des agrégats insolubles n'est pas nécessaire à l'apparition de cette toxicité au moins dans les premiers stades de la progression de la maladie (Wittmann *et al.*, 2001). De plus, dans un modèle répressible de souris transgéniques exprimant la protéine Tau humaine avec la mutation

P301L, l'arrêt de l'expression de Tau atténue les déficits cognitifs et la mort neuronale tandis que les agrégats continuent de s'accumuler (Santacruz *et al.*, 2005).

Par ailleurs, les neurones avec des agrégats de Tau peuvent survivre plusieurs décennies sans causer la mort des neurones (Morsch *et al.*, 1999). Plusieurs études laissent d'ailleurs suggérer un effet protecteur de ces agrégats contre le stress oxydant. En effet, le stress oxydant apparaît très précocement au cours de maladies comme la MA et diminue en parallèle de l'augmentation des DNF. La formation des agrégats pourrait alors constituer une réponse protectrice contre le stress oxydant (Nunomura *et al.*, 2001).

Cependant, de nombreuses études décrivent la présence, dans les agrégats, de protéines Tau normales, d'autres MAPs telles que MAP1 et MAP 2 (Alonso *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1997) ainsi que d'autres protéines de natures diverses tels que Fe65, la thrombine, des kinases et des protéoglycanes indiquant que les agrégats sont capables de piéger des protéines dans leur structure (Arai *et al.*, 2006; Delatour *et al.*, 2001; Leroy *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 1991). En séquestrant ces protéines, ils perturbent également la dynamique microtubulaire, les fonctions des protéines séquestrées et la physiologie du neurone de manière plus générale.

La toxicité de l'agrégation de Tau apparaît donc être à la fois due à une perte de fonction des protéines Tau physiologiques et à un gain de fonction pathologique des protéines Tau anormales. Bien que les agrégats insolubles soient de plus en plus décrits comme des structures inertes voir protectrices capables de piéger des formes plus toxiques de Tau, ils mènent, à terme, à une perturbation des fonctions physiologiques de la cellule. Néanmoins, la réelle implication des différentes formes pathologiques de Tau (protéines hyperphosphorylées, oligomères solubles, ou agrégats insolubles) dans la toxicité neuronale reste à être déterminée.

En conclusion, les Tauopathies se caractérisent par des phénotypes très hétérogènes. Les profils biochimiques, les agrégats spécifiques, l'origine et la localisation des lésions dans les régions du cerveau ne sont pas identiques. Cependant, ces maladies partagent certaines caractéristiques : elles sont définies par des signatures biochimiques spécifiques, une hyperphosphorylation et une phosphorylation pathologique des protéines et leur agrégation sous forme de filaments dont la progression est hiérarchisée et coïncide avec l'apparition des symptômes cliniques.

Les origines de l'apparition des lésions ne sont pas toujours connues. Dans certains cas, la présence de mutations pathologiques du gène codant pour Tau est directement

responsable de certaines Tauopathies comme les DFTP-17. Par ailleurs, la présence des mutations du gène MAPT est suffisante pour conduire à l'apparition de maladies ce qui souligne l'importance des protéines Tau et de leur altération dans la physiopathologie des Tauopathies.

2. 3. Tauopathies et dommages à l'ADN

2. 3. 1. Origines des lésions de l'ADN dans les neurones

Les lésions ou dommages de l'ADN correspondent à toute modification non physiologique de l'ADN qui perturbe les propriétés de codage ou des fonctions normales de transcription et réplication. Tout au long de la vie, les molécules d'ADN des cellules y sont soumises. En effet, on estime que l'ADN d'une cellule humaine moyenne subit plusieurs dizaines de milliers de lésions par cellule et par jour, dans des conditions habituelles d'activité métabolique et d'exposition aux facteurs environnementaux (Nakamura and Swenberg, 1999). Il existe deux sources de lésions de l'ADN : certaines sont causées par des agents exogènes comme les rayons ultra-violetes ou ionisants, la pollution, la chaleur etc.... d'autres sont dues à des agents endogènes générés par le métabolisme cellulaire. Ainsi, les espèces réactives de l'oxygène, les ROS (pour le terme anglais « *reactive oxygen species* ») sont formées en permanence dans l'organisme et sont la conséquence du métabolisme cellulaire normal. En plus de l'oxydation directe par les ROS, l'ADN peut subir des changements par des produits de la peroxydation lipidique causée par l'attaque des acides gras polyinsaturés par les ROS. Les actions génotoxiques de ces agents, et en particulier de ROS sont dramatiques (Pour revue (Bergamini *et al.*, 2004)). Ils sont responsables de la formation de nombreux dommages notamment des modifications des protéines, des lipides et surtout des lésions au niveau de l'ADN telles que la formation de sites apuriques\apirimidiques, des désaminations, des liaisons covalentes (dimères de thymine), des lésions oxydatives, des coupures, des cassures, ou des mésappariements de bases (pour revue (Rao,1993)).

Ces dommages concernent tous les types cellulaires de l'organisme, cependant, certaines cellules y semblent plus vulnérables, en particulier les neurones. En effet, les neurones sont des cellules post mitotiques, ce qui implique que dans le cas où les dommages sont irréversibles et conduisent à la mort des neurones, ces derniers ne sont pas remplacés. De ce fait, ils doivent survivre aussi longtemps que l'organisme et doivent donc élaborer des mécanismes de défense efficaces pour assurer leur longévité.

De plus, les neurones sont particulièrement vulnérables au stress oxydant à cause de la forte consommation en oxygène du cerveau et l'importante proportion en acides gras poly insaturés. Les neurones se caractérisent également par des taux de transcription et traduction élevés associés à une forte activité métabolique et mitochondriale. Cette importante activité métabolique génère de grande quantité de ROS qui endommagent l'ADN créant un environnement de stress (pour revue (Barzilai *et al.*, 2008)).

Il existe plusieurs types de mécanismes de réparation de l'ADN capables de réparer la plupart des dommages de l'ADN comme par exemple le système de réparation par excision de base ou BER (pour le terme anglais « base excision repair »), par excision de nucléotide, NER (pour le terme anglais « nucleotide excision repair ») ou la réparation de mésappariement, MMR (pour le terme anglais « mismatch repair ») (pour revue (Kulkarni and Wilson, 2008)). L'efficacité de réparation dépend de nombreux facteurs, comme le type de cellule, l'âge de la cellule et l'environnement extracellulaire. Dans le cerveau, l'efficacité de réparation semble de plus dépendre du type de neurone rendant certaines sous populations plus vulnérables que d'autres aux différentes attaques (Giovannelli *et al.*, 2003).

2. 3. 2. Dommages à l'ADN dans les Tauopathies

L'accumulation de dommages et le déclin des mécanismes de réparation dans les neurones sont des phénomènes généraux dans le cerveau âgé et sont considérés comme les contribuant majeur du vieillissement. Les modifications oxydatives des ARN, ADN nucléaire et mitochondriale sont susceptibles de jouer un rôle clé dans les processus de mort neuronale sélective associés à l'âge (Cardozo-Pelaez *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2004; Sai *et al.*, 1992) mais également dans les mécanismes de neurodégénérescence observée dans les Tauopathies et en particulier dans la maladie d'Alzheimer (Nunomura *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005).

En effet, des taux élevés de lésions de l'ADN sont observés dans plusieurs maladies neurodégénératives. Dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, plusieurs études ont mis en évidence une augmentation significative des dommages oxydatifs de l'ADN mitochondrial et nucléaire dans certaines régions du cerveau en particulier dans les lobes temporaux, pariétaux et frontaux comparée aux cerveaux de sujet sains (Gabbita *et al.*, 1998; Lyras *et al.*, 1997; Mecocci *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2005). Par exemple, le taux de cassures est deux fois plus élevé dans le cortex cérébral de patients Alzheimer (Mullaart *et al.*, 1990). L'accumulation des lésions au niveau de l'ADN est probablement due à une augmentation du stress oxydant et/ou une baisse de leur capacité de réparation des

dommages. En effet, l'augmentation des dommages oxydatifs dans les maladies neurodégénératives s'accompagne souvent d'une baisse des mécanismes de défense anti-oxydante (Furuta *et al.*, 2001; Jacobsen *et al.*, 2004; Shackelford, 2006). De plus, dans plusieurs Tauopathies comme la MA, la PSP ou la maladie de Pick, le stress oxydant est observé précocement dans certaines régions vulnérables du cerveau affectées par les lésions responsables de la neurodégénérescence (Albers *et al.*, 1999; Castellani *et al.*, 1995; Hartzler *et al.*, 2002; Komori *et al.*, 1998; Odetti *et al.*, 2000). Dans la MA, des études ont mis en évidence une augmentation de certaines lésions de l'ADN entre des patients contrôles et des patients dits MCI (pour le terme anglais « Mild cognitif impairment ») c'est à dire présentant des troubles cognitifs légers, mais pas entre les patients MCI et ceux atteints de MA avérée suggérant que les dommages apparaissent dans les stades précoces de la maladie (Wang *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que ces dommages ne sont peut être pas simplement des événements secondaires mais pourraient participer aux mécanismes liés à la neurodégénérescence.

Par ailleurs, dans le cerveau de souris, il a été montré que les régions touchées par les agrégats de Tau sont les mêmes que celles qui montrent une accumulation de dommages associés à l'âge (Schmitz *et al.*, 1999). Par conséquent, la vulnérabilité de certaines populations neuronales pourrait être en partie due au fait que certains types de neurones dans le cerveau humain accumulent des dommages à l'ADN qui ne sont pas éliminés avec l'âge. Ces neurones deviendraient alors particulièrement vulnérables à la formation d'inclusions de Tau.

En conclusion, de multiples études ont montré une augmentation des dommages de l'ADN nucléaire et mitochondrial associée à une diminution de la capacité de réparation de l'ADN dans les neurones de cerveau de patients atteint de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Ces dommages semblent apparaître de manière très précoce suggérant une contribution de ces lésions dans la physiopathologie de ces maladies (Keller *et al.*, 2005; Markesbery *et al.*, 2005; Nunomura *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006).

Objectif de l'étude

Objectif de l'étude

Des modifications pathologiques de Tau, en particulier une dérégulation de la phosphorylation et la formation d'agrégats dans les neurones sont au cœur d'un processus dégénératif observé dans un certain nombre de maladies neurodégénératives : les Tauopathies. Bien que l'origine des formes pathologiques de Tau ne soit pas clairement établie, l'altération de Tau conduit à une perte de ses fonctions responsable, au moins en partie, du dysfonctionnement neuronal.

Notre laboratoire s'intéresse à la fonctionnalité de Tau dans les neurones et à l'implication de Tau dans les mécanismes conduisant à la neurodégénérescence.

Les protéines Tau sont majoritairement exprimées dans les neurones. Elles sont principalement connues pour leur association aux microtubules et leur fonction de régulation de la dynamique microtubulaire essentielle au maintien de la morphologie et de la fonctionnalité des neurones. Tau est également présente dans le noyau de nombreux types cellulaires et neuronaux, cependant sa fonction nucléaire dans les neurones est inconnue. *In vitro* et *in situ*, il a été montré que Tau se lie à l'ADN au niveau de séquences riches en A/T. Des travaux réalisés *in vitro* ont, de plus, décrit un rôle protecteur vis-à-vis de l'ADN en particulier contre l'attaque par les radicaux libres.

Le but de cette étude est de caractériser la protéine Tau nucléaire et d'étudier le rôle de Tau dans l'intégrité de l'ADN des neurones en situation de stress, plus particulièrement lors de stress modulant la phosphorylation de Tau comme un stress thermique ou un stress oxydant.

Ainsi, l'étude présentée dans ce manuscrit s'est orientée autour de deux objectifs :

- Les travaux présentés dans la première partie visent à **étudier l'implication de la phosphorylation dans la localisation de Tau et le rôle de Tau nucléaire dans la protection de l'ADN neuronal en condition de stress** Pour cela, nous avons modulé l'état de phosphorylation de Tau dans les neurones grâce à différents stress. Différents travaux ont montré qu'un stress hyperthermique induit une déphosphorylation de Tau tandis qu'un stress

hypothermique conduit à une hyperphosphorylation de la protéine (Feng *et al.*, 2005; Galas *et al.*, 2006; Papasozomenos, 1996; Planel *et al.*, 2004).

- La seconde partie de l'étude a pour objectif d'**étudier l'implication potentielle de régions de Tau dans la translocation nucléaire de la protéine** en condition de stress hyperthermique.

Ce travail à été réalisé à l'aide de deux types de modèle: des modèles cellulaires avec l'utilisation de cultures primaires de neurones corticaux embryonnaires murins ainsi que l'utilisation de la lignée cellulaire de neuroblastomes SH-SY5Y stablement transfectées avec différentes isoformes de Tau et un modèle *ex vivo* de coupes de cortex de souris adultes.

Résultats

Résultats

1. Rôle de Tau nucléaire dans la protection de l'ADN neuronal en condition de stress: implication de la phosphorylation de Tau**1. 1. Effets d'un stress hyperthermique sur la localisation et la fonction de Tau dans le noyau des neurones.***1. 1. 1. Objectifs*

Tau est une protéine associée aux microtubules dont la principale fonction connue est de promouvoir l'assemblage et la stabilisation des microtubules dans les neurones. Par cette interaction, elle participe à la mise en place de la polarité neuronale et assure le maintien d'une architecture cellulaire normale. Elle intervient également dans la régulation du transport axonal, essentielle au bon fonctionnement des neurones. De part ses fonctions, Tau est principalement une protéine cytosolique. Cependant, d'autres localisations ont été décrites notamment au niveau de la membrane plasmique en interaction avec certains composants membranaires tels que Fyn ou PLC- γ (Klein *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1998; Reynolds *et al.*, 2008). Tau est également présente dans le noyau de plusieurs types cellulaires dont les neurones (Brady *et al.*, 1995; Gomez de Barreda *et al.*, 2010). Par ailleurs, des données *in vitro* indiquent que Tau se lie à l'ADN, et plus particulièrement au niveau de certaines séquences spécifiques telles que des séquences A/T riches situées dans le petit sillon de l'ADN. Par cette interaction, elle est capable de protéger la double hélice des dommages induits par la DNase 1 et par des radicaux libres *in vitro* (Wei *et al.*, 2008). Au contraire, d'autres travaux *in vitro* suggèrent que Tau, en se liant aux molécules d'ADN, modifierait la conformation de la double hélice, déstabilisant l'ADN et le rendant plus sensible à la digestion par les DNases (Padmaraju *et al.*, 2010).

In situ, dans les neurones, le rôle de Tau nucléaire n'a jamais été étudié. Est-il capable de se lier l'ADN? A t'il un rôle protecteur ou, au contraire, perturbe t'il la stabilité de l'ADN? La fonction de Tau sur l'ADN et de manière plus générale dans le noyau des neurones reste, par conséquent, une question posée.

Dans cette première partie, nous avons étudié les effets du stress sur l'état de phosphorylation de Tau et sa localisation subcellulaire dans les neurones. Pour cela, nous avons testé les effets d'un stress hyperthermique ou oxydant, connus pour déphosphoryler Tau sur de nombreux

sites notamment par l'activation de la phosphatase PP2A (Davis *et al.*, 1997; Galas *et al.*, 2006; Papasozomenos, 1996; Zambrano *et al.*, 2004).

Les effets d'un stress hyperthermique ou oxydant ont été analysés dans des neurones corticaux issus d'embryons de souris à 10 jours de mise en culture (10 DIV, pour le terme anglais « day in vitro »), stade auquel les neurones sont majoritairement différenciés. De plus, la phosphorylation basale de Tau est élevée. En effet, l'état de phosphorylation de la protéine varie en fonction du temps de mise en culture. Au delà de 10-12 DIV, la phosphorylation des protéines Tau diminue (Liu *et al.*, 2004c). Ce temps de mise en culture nous permet ainsi de mieux visualiser une déphosphorylation en réponse à un stress hyperthermique.

Les effets d'un stress hyperthermique sur la localisation de Tau ont également été analysés dans des neurones adultes à l'aide d'un modèle *ex vivo*, plus précisément, dans des neurones provenant de coupes de cortex de souris adultes afin de se placer dans un contexte plus physiologique et s'affranchir de l'origine embryonnaire des cultures.

Nous avons ensuite étudié la capacité de Tau à interagir avec l'ADN et testé sa fonction potentiellement régulatrice de l'intégrité de l'ADN en condition de stress hyperthermique dans les neurones en culture.

1.1.2. Résultats

Les résultats de ce travail sont soumis pour publication et sont présentés sous la forme d'un article:

NUCLEAR TAU : A KEY PLAYER IN NEURONAL DNA PROTECTION

Audrey Sultan¹, Fabrice Nessler², Marie Violet¹, Séverine Bégard¹, Anne Loyens¹, Smail Talahari², Zeyni Mansuroglu³, Daniel Marzin², Nicolas Sergeant¹, Sandrine Humez¹, Morvane Colin¹, Eliette Bonnefoy³, Luc Buée¹, and Marie-Christine Galas¹

From Inserm UMR837, Alzheimer & Tauopathies, rue Michel Polonovski, Lille, France ; Univ Lille-Nord de France, UDSL, JP Aubert Research Centre, IMPRT, Lille, France; Faculte de Medecine-Pole Recherche, Lille, France ; CHU-Lille, Lille, France¹

Laboratoire de Toxicologie Génétique -Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, 59019 Lille Cedex, France²

CNRS FRE 3235, Régulation de la Transcription et Maladies Génétiques, Université Paris Descartes, 45 rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France³

Running head: Nuclear Tau: a key player in DNA protection

Address correspondence to : Marie-Christine Galas, Inserm U837, Alzheimer & Tauopathies, 1 rue Michel Polonovski, Lille, France. Tel: +33 (0) 320 622073. Fax : +33 (0) 320 538562. E-mail : marie-christine.galas@inserm.fr

Tau, a neuronal protein involved in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease that is primarily described as a microtubule-associated protein, has also been observed in the nuclei of neuronal and non-neuronal cells. However, the function of the nuclear form of Tau in neurons has not yet been elucidated. In this work, we demonstrate that acute oxidative stress and mild heat stress (HS) induce the accumulation of dephosphorylated Tau in neuronal nuclei. Using chromatin immunoprecipitation assays, we demonstrate that the capacity of endogenous Tau to interact with neuronal DNA increased following HS. Comet assays performed on both wild-type and Tau-deficient neuronal cultures showed that Tau fully protected neuronal genomic DNA against HS-induced damage. Interestingly, HS-induced DNA damage observed in Tau-deficient cells was completely rescued after the over-expression of hTau (human Tau) targeted to the nucleus. These results highlight a novel role for nuclear Tau as a key player in early stress response.

Tau was first described as an essential factor for cytoskeletal microtubule assembly (1). Since then, Tau has been primarily described as a regulator of microtubule dynamics. However, due to its diverse cellular distribution, Tau likely has multiple functions. Furthermore, although Tau is primarily seen as a cytosolic protein, the nuclear localization of Tau has been described in neuronal (2,3) and non-neuronal cells (4,5). In mitotic HeLa cells and fibroblasts, Tau is localized to the nucleolus and is associated with

the nucleolar organizer regions and it has been suggested that Tau plays a role in the nucleolar organization and/or heterochromatinization of rRNA genes (6).

Interestingly, *in vitro* studies have shown that purified Tau directly binds to polynucleotides with a preference toward AT-rich DNA compared to GC-rich DNA sequences. However, contradictory *in vitro* results have shown a protective or deleterious role of Tau in DNA integrity (7,8,9). In addition, a recent study reported chromosomal aberrations in fibroblasts and lymphocytes from patients carrying a Tau mutation (10).

Nevertheless, although Tau has been detected in brain nuclei (11), the function of neuronal nuclear Tau has not yet been elucidated. Furthermore, unlike other proteins present in both cellular compartments, nucleo-cytoplasmic shuttling of Tau has not yet been reported. The protection of genomic integrity is a major challenge for living cells that are continuously exposed to DNA-damaging injuries, especially in the brain. However, whether endogenous Tau has the capacity to protect neuronal DNA *in situ* has remained an open question. In this study, we aimed to investigate the potential protective effects of Tau against DNA damage in central neurons.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Primary embryonic neuronal culture- Wild type and knock-out Tau mouse primary cortical cultures were prepared as previously described (12).

Adenovirus growth and labeling- HAdV-5-hTau44Wt (wild-type Tau isoform 2-3-10-) and

HAdV-5-hTau44-NLS were constructed using the gateway system (Invitrogen), and they were amplified and purified in our laboratory as previously described (13). HAdV-5-hTau44-NLS was obtained by insertion of a nuclear localization signal (NLS) from the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 (14) to the N-terminal part of human Tau. After standard virus purification by ultracentrifugation in CsCl gradient, viral genomes were quantified by measuring UV absorption at 260 nm, and the virus titer was expressed as viral physical particles (PP) per ml.

HAdV infection- Primary cultured cells were seeded in 6-well culture plates at a density of 1.28×10^6 cells per well. Cells were then infected with 2000 PP/cell of HAdV-5-hTau44 or HAdV-5-hTau44NLS vectors for 2 h at 37°C in minimum volume. Culture medium was added following infection for 24 h at 37°C.

Cell treatment- At 10 DIV, cells were maintained at 37°C (C) or exposed to 44 °C (HS) in a 5% CO₂ incubator for 1 h, or to 1 mM H₂O₂ for 1 h at 37°C. Netropsin dihydrochloride (Sigma Aldrich) or methyl green (Sigma Aldrich) was added 1 h before and not removed during treatment.

Antibodies- Anti-Tau antibodies have been previously described (12,15). The anti-lamin B and anti-Hsc70 antibodies were obtained from Santa-Cruz, the anti-Tau3R from Sigma and the anti-human Tau antibody HT7 from Thermo Scientific.

Cell fractionation- Cell fractionation was prepared as previously described (16).

Electrophoresis and immunoblotting- Aliquots of cytoplasmic or nuclear extracts were processed as previously described (12). Immunolabeling was observed with an Image Reader LAS3000 (Fujifilm) and quantified by densitometry. Phosphorylated and total Tau levels were normalized against synaptophysin for the cytoplasmic fraction and Lamin B for the nuclear fraction.

Phosphorylated Tau levels were further normalized against the level of total Tau to measure the exact phosphorylation state.

Lactate dehydrogenase assay- LDH assay was assayed as described by the manufacturer (Promega, WI, USA).

Immunofluorescence- Cell cultures were fixed in cold 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Permeabilization was carried out in 0.2% Triton X-100 in phosphate-buffered saline for 10 min. After a 30-min saturation in 2%

bovine serum albumin, immunostainings were carried out using Tau antibodies. Tau staining was revealed with goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG (H+L) antibodies coupled to Alexa Fluor®488 (Molecular Probes). DAPI was present in the Vectashield mounting medium for fluorescence (Vector). Slides were analyzed with a Zeiss LSM710 confocal laser scanning microscope (60x magnification). Images were collected in the z direction at 0.50 •m intervals. For Tau1 labeling, cells were incubated with 1 •M ToPro3 (Molecular Probe) for 30 min. and analyzed with a Leica-DMRBE microscope with TCS 4D confocal head. Alternatively, permeabilization (0.2% Triton X-100 in phosphate-buffered saline for 10 min) was carried out before 10 min iced-cold methanol fixation to remove soluble proteins.

Electron microscopy- Cell cultures were fixed with 0.05% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.2 M Pipes buffer for 30 min at 4°C. Cells were then incubated in phosphate-buffered saline containing 10% fetal calf serum, scraped, and centrifuged at 15000xg. Pellets were soaked overnight in phosphate-buffered saline containing 2.3 M sucrose and 20% polyvinyl pyrrolidone. Cells were rapidly frozen in liquid nitrogen. Frozen ultrathin sections were made with a cryo-ultramicrotome (Leica) at a thickness of 85 nm. The sections were picked up on formvar-carbon-coated nickel grids. After a 30-min saturation in 2% bovine serum albumin, immunostaining was carried out using Tau5, an anti-total Tau antibody. Tau5 staining was revealed with a goat anti-mouse IgG gold conjugate (12 nm in diameter) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA). Negative staining of the ultrathin sections was carried out using 0.4% uranyl acetate and 1.8% methyl cellulose. Labeling was observed under a Zeiss 902 electron microscope.

Chromatin immunoprecipitation- Chromatin immunoprecipitation was carried out as previously described (18). Genomic DNA from control and HS-treated cells were immunoprecipitated either with Tau1 antibody or with a polyclonal antibody directed against the nonstructural NSs protein encoded by Rift Valley Fever Virus (a generous gift from Dr. Michèle Bouloy). Immunoprecipitated and input (corresponding to 2 g of total non-immunoprecipitated genomic DNA) DNAs were 5'-end radioactively labeled using T4 polynucleotide kinase (exchange reaction) and γ -32P ATP (3000 Ci/mmol). 32P-labeled DNA

was quantified after migration on a non-denaturing polyacrylamide gel using a PhosphoImager.

Comet and fast halo assays- Comet and fast halo assays (4 cells/slide) were embedded in a layer of 0.5% of low melting point agarose (LMPA) (Bio-Rad) and kept at 37 °C previously coated upon slides. Slides were replaced on a slide tray on ice packs for 3 to 5 minutes. Four slides (2 for the non-denaturing fast halo assay and 2 for the Comet assay) were prepared for each cell suspension.

Non-denaturing fast halo assay- The fast halo assay was used to identify DNA fragmentation due to apoptosis and/or necrosis and/or true genotoxicity. It was performed under alkaline conditions following the procedure of Sestili et al. (19). The essential steps of the fast halo assay were the following: Slides were immersed in the pH 10.1 lysis solution for 10 minutes at + 4 °C in the dark. The slides were then rinsed in PBS for less than 30 seconds and neutralized for 15 minutes in PBS (pH 7.4) containing 0.1 mg/mL RNase. The DNA was then exposed for 5 minutes to absolute ethanol to preserve all the halo assay slides.

Comet assay- After the top layer of agarose had solidified, the slides were immersed for at least 1 hour at + 4 °C in the dark in a lysis solution consisting of 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10, to which 1% Triton X-100 and 10% DMSO were freshly added. The slides were then removed and placed on a horizontal gel electrophoresis unit and the unit filled was with freshly prepared alkaline buffer (1 mM EDTA and 300 mM NaOH, pH > 13) to around 0.25 cm above the slides. To reduce the variability associated with gel box slide position or multiple electrophoresis runs, slides were randomly distributed. The cells were exposed to the alkaline solution for 20 minutes to allow DNA unwinding and expression of single-strand breaks and alkali-labile sites. Next, electrophoresis was conducted for 20 minutes at 0-4°C by applying an electric current of 0.7 V / cm (25 V / 300 mA). All of these steps were conducted in the absence of daylight to prevent additional DNA damage. After electrophoresis, the slides were neutralized with 0.4 M tris (pH 7.5) and the DNA was exposed for 5 minutes to absolute ethanol to preserve all the comet assay samples. Subsequently, the slides were air-dried and then stored at room temperature until scored for DNA migration (20).

Scoring- Just prior to scoring, the DNA was stained using propidium iodide (20 µg/mL distilled water; 25 µL/slide). Slides were coded and examined at 200 x magnification using a fluorescent microscope (Leica Microsystems SAS -DM 2000, Heerbrugg, Switzerland), equipped with an excitation filter of 515-560 nm and a barrier filter of 590 nm, connected through a gated monochrome CCD IEEE1394 FireWire video camera (Allied Vision Technologies) to a Comet Assay IV Image Analysis System, version 4.11, with Windows XP Pro Software (Perceptive Instruments Ltd, Suffolk, UK). Images of at least 50 randomly selected cells were analyzed from the 2 slides prepared, i.e., 100 cells per culture. For the fast Halo assay, 100 hundred cells per slide were also randomly scored.

Choice of DNA damage parameters- The Olive tail moment (OTM), developed by Olive (21), was used to evaluate DNA damage. The OTM, expressed in arbitrary units, is calculated by multiplying the percent of DNA (fluorescence) in the tail by the length of the tail in µm (22). The tail length is measured between the edge of comet head and the end of the comet tail. A major advantage of using the OTM as an index of DNA damage is that both the amount of damaged DNA and the distance of migration of the genetic material in the tail are represented by a single number (23).

Subcellular fractionation from brain slices- Brain slices were prepared as previously described (17). Mouse brains were quickly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing: 117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 23 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, and 25 mM glucose, continuously oxygenated with 95% O₂, 5% CO₂ (pH 7.4). Transverse brain slices (400 µm) were cut using a Vibratome (Leica, Wetzlar, Germany). Slices were obtained from 1.70 mm anterior to the bregma. For each allow recovery from damage, the slices were maintained for 30 min at room temperature in home-made incubation chambers containing ACSF and continuously bubbled with 95% O₂, 5% CO₂. The slices were then transferred to oxygenated ACSF at 37°C for 1 hour. For each brain, one of the two batches was then transferred to oxygenated ACSF at 44°C for 1 hour and the other one was kept at 37 °C. Slices were then dissected and the appropriate quantity of cortex was removed.

Analysis and Statistics- Results are expressed as means ± S.D of at least three independent

experiments. Image J software was used for quantification. The Mann-Whitney test and the 2-way ANOVA test were used to statistically analyze the expression of proteins visualized by western blots.

The student t-test was used to statistically analyze the OTM values in the Comet assay.

RESULTS

Oxidative stress and heat stress induce nuclear accumulation of Tau. Mild hyperthermia shares common mechanisms with oxidative stress such as that induced by exposure to H₂O₂ and reactive oxygen species (ROS) production (24,25). H₂O₂ and heat shock (HS) were previously reported to reduce the phosphorylation of Tau in neuronal cultures through protein phosphatase 2A activation (26,12). Given that neuronal nuclear Tau has primarily been described under a dephosphorylated state, based on Tau1 labeling using an antibody (27), we asked whether oxidative stress or HS could modulate the cellular localization of Tau. The influence of H₂O₂ and HS on the cellular localization of Tau was evaluated in neurons by exposing cortical primary cultures of neurons to 1 mM H₂O₂ or hyperthermia (44°C) for 1 h. H₂O₂ (Figure 1A) and HS (Figure 1B) induced a strong increase in Tau level in the nuclear fraction. A slight but significant decrease in Tau level was also detected in the cytosol after both stresses. Low-molecular weight bands, indicative of Tau degradation, were not detected in the nucleus. HS-induced dephosphorylation of Tau was analyzed by immunoblotting with Tau1 antibody, which recognizes Tau only when serine residues (195–202) are dephosphorylated. Dephosphorylated Tau, detected by Tau1, increased after oxidative and heat treatment in both cytosolic and nuclear fractions. Taken together, our results suggest that both stresses induced Tau dephosphorylation and increased the nuclear localization of dephosphorylated Tau in cultured neurons.

H₂O₂ induces cytotoxicity in neuronal cultures. A lactate dehydrogenase (LDH) assay was used to test the effect of 1-h H₂O₂ and HS treatments on cell viability in cultured cortical neurons and after a recovery of 24 or 48 h at 37°C (Figure 2). Only H₂O₂ significantly increased LDH release 24 h after treatment. These results show that an acute stress induced by H₂O₂ induces cell death in neuronal cultures. Contrary to H₂O₂, stress induced by mild hyperthermia was not cytotoxic, demonstrating that HS-induced accumulation of

Tau in the nuclei of neurons did not induce cell death. Mild hyperthermia was chosen in the following study to characterize and study the function of stress-induced nuclear Tau accumulation, free from interfering cell death mechanisms.

Heat stress-induced nuclear accumulation of Tau is reversible. To study the consequences of HS-induced accumulation of nuclear Tau, cells were allowed to recover for 24 h at 37°C after HS. The results shown in Figure 3A and B demonstrate that the level of nuclear Tau, as detected by anti-total Tau and Tau1 antibody, was strongly reduced after heat-stressed cells recovered at 37°C, with the amount of nuclear Tau returning to a level similar to that observed before HS. The absence of lower molecular-weight bands indicates that Tau was not degraded. These results suggest that stress-induced Tau dephosphorylation and nuclear accumulation is reversible.

Nuclear Tau under heat stress is mainly dephosphorylated. The results obtained with Tau1 antibody in Figure 1B suggested that HS induced the dephosphorylation of Tau. HS-induced dephosphorylation of Tau was further confirmed by immunoblotting with the phospho-dependent Tau antibodies anti-pT212-Tau, AT180, 12E8 and AD2. Figure 4A illustrates that HS led to a strong decrease of phosphorylated Tau. None of these phosphorylated forms of Tau were detected in the nuclear fraction under control or HS conditions, confirming that the dephosphorylated state of the nuclear form of Tau accumulated after HS.

Heat stress-induced nuclear accumulation of Tau is reproduced in adult neurons. In primary neuronal cultures, neurons were studied after 10 days *in vitro* (DIV) and thus were mainly differentiated. Nevertheless, to overcome any potential artifactual effects related to the embryonic origin of the neurons, we also tested the effect of HS in the adult mouse brain. Ex vivo slices from the cerebral cortex of adult mice were incubated for 1 h at 37°C or 44°C, and the cytosolic and nuclear fractions were analyzed under the same conditions as in Figure 1B and Figure 4A. Hyperthermia induced an increase in the level of nuclear Tau in the adult mouse brain, as previously observed in embryonic neuronal cultures. The phosphorylation state of stress-induced nuclear Tau was analyzed in brain slices from adult mice (Figure 4B) using the same phospho-specific antibodies as in Figure 4A. Similar results were obtained with Tau1 (as in

Figure 1B), P-T212, AT180 and AD2 antibodies, but not with the 12E8 antibody. At 37°C as well as after HS, nuclear Tau was detected not only with Tau1 but also, surprisingly, with 12E8. Under HS, a specific increase of Tau1 and 12E8 labeling was observed. Overall, these data indicate that in the *ex vivo* model of cortical slices, nuclear Tau was mainly dephosphorylated both in the control condition and under HS, except for at Ser262-356 (KXGS motifs). This is consistent with previous findings that Tau is mainly dephosphorylated, except at Ser262, in cerebral extracts from heat-shocked rats (28). Interestingly, although the majority of Ser/Thr-Pro sites that flank the microtubule-binding repeats are phosphorylated by so-called Ser/Thr-Pro kinases such as cdk5 and GSK3 (15), Ser262 and Ser356 are located within microtubule-binding domains and form KXGS motifs that are preferentially phosphorylated by MARK/Par-1 kinase, CamKII or ChK2 (29,30,31). A differential expression and/or regulation of these kinases between embryonic and adult neurons could explain the differences observed here with the Tau 12E8 antibody.

Microscopic visualization of heat stress-induced accumulation of Tau in neuronal cells. The accumulation of Tau in the nuclei of neuronal cultures after HS was further analyzed by immunofluorescence and confocal microscopy analysis (Figure 5A,B,C). Under the control condition, total Tau antibody clearly stained the cellular body and neurites but only weakly labeled the nucleus (Figure 5A, upper panel). Under the HS condition, however, accumulation of Tau was clearly observed in the nuclei of cortical primary cultured neurons (Figure 5A, lower panel).

The location of Tau was also studied after removing soluble proteins by permeabilization of the cells before ice-cold methanol fixation (Figure 5B). In this condition, Tau tightly bound to insoluble cell structures (“bound” Tau) was immunolabeled using an anti-total Tau antibody. Nuclear fluorescence was quantified using a Zeiss confocal microscope program. The average ratio of bound Tau under the HS versus the control (HS/C) condition was 2.06 ± 0.17 ($p < 0.001$).

The accumulation of dephosphorylated Tau in the nuclei of neuronal cultures after HS was illustrated using Tau1 antibody (Figure 5C). Under control conditions, no labeling was detected in neuronal nuclei, and only weak labeling was observed in the cellular body

(Figure 5C, upper panel). Conversely, clear staining of dephosphorylated Tau was detected on the entire cell body and the nucleus after HS treatment (Figure 5C, lower panel).

The accumulation of nuclear Tau under HS was also visualized by electron microscopy (Figure 6). Tau was detected in the nuclei of frozen sections derived from cortical neuronal cultures only under stress conditions (Figure 6CI,II,III) associated with DNA (light-gray regions in 6CII) as well as with nucleoli (Figure 6CIII). This nucleolar localization is consistent with previous studies describing nucleolar localization of Tau in various cell lines (4,6,10).

Heat stress potentiates Tau–DNA complex formation. The ability of Tau to form protein–DNA complexes *in vitro* has been previously reported by different groups (32,33,6,8). To analyze the ability of Tau to interact *in situ* with neuronal DNA before and after HS treatment, we carried out chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments (Figure 7). During these experiments, genomic DNA from control and HS-treated cells was immunoprecipitated with either Tau1 antibody or an antibody directed against the nonstructural NSs protein encoded by the Rift Valley fever virus, which was used here as an arbitrary negative control. The total amount of immunoprecipitated DNA was labeled at the 5'-end with ^{32}P -YATP and submitted to non-denaturing polyacrylamide electrophoresis (Figure 7). These results indicate that the capacity of Tau protein to interact with DNA, previously described *in vitro*, could also be observed *in situ* in a dose-dependent manner. In addition, we found that the total amount of DNA interacting with nuclear Tau was about two-fold higher in heat-stressed cells compared to control cells (Figure 7). The difference was even more significant considering that overall labeling of input DNA, corresponding to total genomic DNA before immunoprecipitation, was slightly weaker after HS compared to the control condition. As expected, no DNA immunoprecipitated with the anti-NSs antibody in control or in HS cells.

In parallel, the concentration of DNA that immunoprecipitated with the anti-Tau1 antibody under control or HS conditions was measured using a Nanodrop spectrophotometer. The average ratio of immunoprecipitated DNA (% of input) under HS versus control (HS/C) conditions was 1.8 ± 0.07 ($p < 0.001$). This result was correlated with the increase in nuclear “bound” Tau observed under HS (Figure 5B). Taken together, these data show that in addition to

enhancing the nuclear fraction of Tau, HS also enhanced the amount of Tau interacting with DNA, suggesting that under the HS condition, the majority of nuclear Tau forms protein–DNA complexes with endogenous cellular DNA.

Agent that competitively binds to the DNA minor groove partially prevents nuclear Tau accumulation. Previous studies demonstrated that, *in vitro*, purified Tau binds to synthesized DNA specifically through the minor groove (8). To assess this specificity *ex vivo*, competitor experiments were performed using netropsin, a naturally occurring antibiotic that binds to the minor groove of DNA in spots rich in AT, and methyl green, a DNA major groove binding drug. Competitive effects were tested on Tau nuclear accumulation (Figure 8A,B). Netropsin significantly decreased the level of nuclear Tau under heat stress conditions. Concentrations from 10 to 25 μM induced a similar effect on nuclear Tau accumulation (data not shown). Identical concentrations of methyl green did not alter heat shock-induced Tau accumulation in the nucleus.

As heat shock is known to induce rapid Hsc70 accumulation into cellular nuclei independent of minor groove binding, the detection of Hsc70 was used first to check the lack of effect of netropsin on the integrity of nuclear shuttling mechanisms and second as a negative control to check the specificity of netropsin binding to DNA at the minor groove. As expected, netropsin did not modify the heat shock-induced nuclear increase of Hsc70. Netropsin partially prevented stress-induced nuclear Tau accumulation. These data suggest that the interaction of nuclear Tau with DNA is partly mediated through interactions with the A/T-rich DNA minor groove and that minor groove-unbound Tau would not remain in the nuclear fraction. Interestingly, if minor groove-unbound Tau does not remain in the nuclear fraction, it suggests that accumulation of Tau into the nucleus under heat stress conditions is subordinate to DNA binding.

Tau deficiency generates heat stress-induced DNA damage. Previous *in vitro* studies have shown that Tau protein is able to prevent DNA from damage induced by thermal denaturation and peroxidation (8,7). To test the role of Tau in neuronal DNA *in situ*, we studied the effect of Tau deficiency on DNA integrity under HS using the single-cell gel electrophoresis assay (the Comet assay) (Figure 9). The Comet assay under alkaline conditions is considered the most sensitive quantitative method for measuring damage to genomic DNA of eukaryotic cells on a

single-cell basis (21). It detects DNA damage as single-stranded and/or double-stranded DNA breaks and DNA–DNA and/or DNA–protein crosslinks at the level of the genome of eukaryotic cells, alkali-labile sites, incomplete DNA repair sites, and changes in chromosome structural conformations (19). The Olive tail moment (OTM) was used to evaluate DNA damage in single cells by measuring the DNA-specific fluorescent staining. The effect of HS on DNA integrity was assessed in both wild-type and Tau-deficient cortical neuronal cultures. Figure 9 shows the ratio of the OTM of HS-treated cells over control cells. DNA migration was strongly reduced in Tau-deficient cells, suggesting DNA damage. Delayed migration of DNA observed in Tau-deficient cells under HS is considered to reflect either DNA crosslinking or bulk adduct formation (34). Conversely, HS did not significantly induce DNA damage in wild-type neuronal cultures, suggesting that Tau can protect neuronal DNA integrity under HS conditions.

To test if the DNA damage detected in Tau-deficient cultures by the Comet assay (Figure 8) reflected cell death, the highly sensitive non-denaturing fast halo assay was used to selectively quantify damaged DNA associated with apoptosis and necrosis (19). As shown in Table I, HS did not induce apoptotic or necrotic features in either wild-type or Tau-deficient cultures, indicating HS-induced DNA damage observed in Tau-deficient neurons was not a consequence of cell death.

Overexpression of nuclear Tau rescues heat stress-induced DNA damage in Tau-deficient neurons. To confirm the role of Tau in protecting DNA against HS-induced damage, Tau-deficient cultures were infected with an adenoviral vector encoding human wild-type Tau (HAdV-5hTau44Wt) and were then subjected to HS. To accurately determine the specific role of nuclear Tau in DNA protection, a nuclear localization signal (NLS) was fused to the hTau sequence (HAdV-5- hTau44-NLS) (Figure 10A). hTau (human Tau), which was predominantly localized in the cytosolic fraction under control conditions, accumulated into the nucleus after HS treatment, whereas most of hTau-NLS was present in the nucleus under both control and stress conditions (Figure 10A). The integrity of DNA after HS was analyzed using the Comet assay in wild-type and Tau-deficient cultures overexpressing hTau or hTau-NLS. As shown in Figure 10B, expression of hTau or hTau-NLS fully prevented HS-

induced DNA damage in Tau-deficient cultures. The complete prevention of DNA damage by nuclear-targeted Tau demonstrated that nuclear localization of Tau was, by itself, sufficient to protect DNA from HS-induced damage and that DNA protection was not related to an indirect cytosolic Tau-induced effect.

DISCUSSION

Here, we report that oxidative or hyperthermic stress induces accumulation of dephosphorylated Tau in the nuclei of embryonic and adult neurons. The presence of Tau in the nuclei of heat-stressed neurons was necessary to protect DNA from HS-induced damage. Tau-mediated genomic DNA protection was correlated with an increase of Tau–DNA binding. This study is the first *in situ* demonstration that oxidative and HS insults modulate nuclear Tau translocation and that nuclear Tau is essential to protect neuronal DNA from HS-induced damage.

Although the presence of Tau in the nuclei of neurons was reported more than 15 years ago (11), this is the first demonstration that environmental conditions can modulate neuronal cytoplasmic–nuclear transport of Tau in a developmentally independent manner. Both nuclear import and export of proteins are highly regulated processes (35). Movement of proteins larger than approximately 40 kDa into the nucleus requires specific transport receptors, the use of the nuclear pore complex and the recognition of specific signals in the cargo protein by a transport receptor. Given that Tau sequences do not include a canonical NLS or a nuclear export signal, cytoplasmic/nuclear translocation of Tau likely requires the interaction of Tau with one or more other proteins to pass through the nuclear pore complex.

Phosphorylation is a biological process that regulates nucleo-cytoplasmic transport (36,37). In this work, we observed that stress-induced dephosphorylation of cytosolic Tau was correlated with nuclear accumulation of Tau. On the other hand, at 24 h after HS, increased cytosolic Tau phosphorylation was associated with decreased nuclear Tau. Rephosphorylation of Tau after HS has been previously reported in a heat shock rat model (28). Taken together, these data suggest that phosphorylation might be a major mechanism to control nuclear Tau shuttling. Further investigation is necessary to decode the mechanisms involved in the nucleo-

cytoplasmic trafficking of Tau in stressed neurons.

Nevertheless, given the strong increase of Tau levels in the nuclear fraction, changes in Tau transcription within the nucleus cannot be fully ruled out. However, as observed with changes in Tau phosphorylation and reversibility, it seems that nucleo-cytoplasmic shuttling of Tau proteins is mainly responsible for the increase in nuclear Tau.

Interestingly, oxidative stress and hyperthermia quickly induce nuclear translocation of molecular chaperones (38,39) as well as proteins involved in the etiopathology of neurodegenerative diseases, such as α -synuclein (40), the amyloid precursor protein (APP) C-terminal fragment (41) or APP partner Fe65 (42) and ataxin-3 (43). Neurons are highly differentiated postmitotic cells that cannot divide and cannot survive after irreversible damage; therefore, neurons are highly susceptible to insult. Because neurons should survive as long as the organism does, they need to employ powerful defense mechanisms to ensure their functionality and long-term survival (44). Altogether our results demonstrate that nuclear Tau emerges as a novel neuronal genome caretaker in stress condition as illustrated in Figure 11.

The capacity of Tau to protect neurons *in situ* from HS-induced DNA damage was correlated with an increased interaction of Tau with genomic DNA. To further characterize Tau–DNA complex formation, we predicted the DNA-binding residues (3) in the Tau sequence (supplemental Fig. 1). This analysis suggested that the proline-rich domain of Tau is highly susceptible to interacting with DNA, especially at the epitopes specifically recognized by Tau1, PT212 and AT180 antibodies. Interestingly, *in vitro* results from EMSA previously implicated the proline-rich domain of Tau in DNA association (8).

Results obtained with netropsin indicates that *in situ* Tau interacted with DNA through the A/T rich minor groove, as previously demonstrated *in vitro* (8). DNA protection by minor groove-binding proteins is a mechanism common to various types of cells for efficient preservation of the integrity of the genome. Histone H1 (45) and high-mobility group box 1 protein (Hmgb1) (46) are chromatin architectural proteins that bind to the minor groove of double-stranded DNA and confer protection to DNA against radiation damage. In prokaryotes, spores of *Bacillus* bacteria represent an astonishing example of a

powerful DNA protection mechanism mediated by minor groove-binding proteins. Dormant spores of *Bacillus* can survive for hundreds of years. Spores of *Bacillus* are extremely resistant to a wide array of extreme insults, including heat, desiccation, toxic chemicals, enzymes and radiation. This spore resistance is mainly due to protection against DNA damage by the binding of small acid-soluble proteins (SASPs) to the DNA minor groove, inducing protective changes in the structure of DNA (47,48). Interestingly, as SASPs, Tau is an acid soluble molecule. Tau has been previously purified from brain extracts based on heat stability and acid solubility derived from a histone purification protocol (49). It is tempting to speculate that DNA safeguards mediated by Tau might reproduce an ancestral mechanism conserved during evolution from prokaryotic cells to highly specialized eukaryotic cells such as neurons to provide powerful resistance to stress insults. Thus, interaction of Tau with DNA through the minor groove might be important for neuronal longevity in the brain. Interest in Tau arose when different laboratories discovered that this protein was the main component of paired helical filaments that compose neurofibrillary tangles (NFT). NFTs are a hallmark of Alzheimer's disease (AD) and other neurodegenerative disorders (the so-called tauopathies) (15). In AD, aberrant modifications

of Tau, including hyper- and abnormal phosphorylation, oxidation, truncation, and conformational changes, induce filamentous aggregation and NFT formation in selectively vulnerable neurons. Accumulation of nuclear DNA damage in neurons has been suggested to be a major form of damage involved in AD (50). Interestingly, the neurons that show NFT formation in AD are the same that show age-related accumulation of nuclear DNA damage (51). An attractive hypothesis would be that pathological alterations of Tau, e.g. hyperphosphorylation, might impair its ability to shuttle between the cytoplasm and the nucleus and/or affect its affinity for DNA. Thus, altered forms of Tau would fail to efficiently protect DNA from insults such as oxidative stress, an early mechanism involved in AD etiopathology. Impairment of DNA protection by altered Tau would contribute to functional failure of neurons and might represent an essential mechanism of AD etiopathology.

In conclusion, this study highlights a new function for Tau as a key player in the neuronal early stress response and demonstrates the dramatic DNA-safeguarding activity of nuclear Tau. The demonstration of a new function for neuronal nuclear Tau may have important implications for a better understanding of neuronal biology and AD etiopathology.

REFERENCES

1. Weingarten, M.D., Lockwood A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975) *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 858-1862.
2. Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990) *Proc Natl Acad Sci* **87**, 8422-8426.
3. Wang, Y., Loomis, P.A., Zinkowski, R.P., and Binder, L. (1993) *J Cell Biol* **121**, 257-267.
4. Thurston, V.C., Zinkowski, R.P., and Binder, L. (1996) *Chromosoma* **105**, 20-30.
5. Cross, D.C., Munoz, J.P., Hernandez, P., and Maccioni, R.B. (2000) *J Cell Biochem* **78**, 305-317.
6. Sjöberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., and Bonnefoy, E. (2006) *J Cell Sci* **119**, 2025-2034.
7. Hua, Q., and He, R.Q. (2003) *Biophys Acta* **1645**, 205-211.
8. Wei, Y., Qu, M.H., Wang, X.S., Chen, L., Wang, D.L., Liu, Y., Hua, Q., and He, R.Q. (2008) *Plos One* **3**, e2006.
9. Padmaraju, V., Indi, S.S., and Rao, K.S.J. (2010) *Neurochem Int* **57**, 51-57.
10. Rossi, G., Dalprà, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F.L., Catania, M., Di Fede, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D., and Tagliavini, F. (2008) *Cell Cycle* **7**, 1788-1794.
11. Brady, R.M., Zinkowski, R.P., and Binder, L. (1995) *Neurobiol Aging* **16**, 479-486.
12. Galas, M.C., Dourlen, P., Bégard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., Buée, L. (2006) *J Biol Chem* **281**, 19296-19304.
13. Rogee, S., Renaut, L., Grellier, E., Mailly, L., D'Halluin, J.C., and Colin, M. (2007) *Mol Ther* **15**, 1963-1972.

14. Hiriart, E., Farjot, G., Gruffat, H., Nguyen, M.V.C., Sergeant, A., and Manet, E. (2003) *J Biol Chem* **278**, 335-342.
15. Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000) *Brain Res Rev* **33**, 95-130.
16. Hamdane, M., Bretteville, A., Sambo, A.V., Schindowski, K., Bégard, S., Delacourte, A., Bertrand, P., and Buée, L. (2005) *J Cell Sci* **118**, 1291-8.
17. Kimura, R., Devi, L., and Ohno, M. (2010) *J Neurochem* **113**, 248-261.
18. Lemay, J., Maidou-Peindara, P., Bader, T., Ennifar, E., Rain, J.C., Benarous, R., and Liu, L.X. (2008) *Retrovirology* **5**, 47.
19. Sestili, P., Martinelli, C., and Stocchi, V. (2006) *Mutation Research* **607**, 205-214.
20. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., and Sasaki, Y.F. (2000) *Environ Mol Mutagen* **35**, 206-21.
21. Olive, P.L., Banath, J.P., and Durand, R.E. (1990) *Radiat Res* **122**, 86-94.
22. Hellman, B., Vaghef, H., and Bostrom, B. (1995) *Mutat Res* **336**, 123-131.
23. Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P., and Browne, M. (1995) *Mutagenesis* **10**, 85-90.
24. Bruskov, V.I., Malakhova, L.V., Masalimov, Z.K., and Chemikov, A.V. (2002) *Nucleic Acids Res* **30**, 1354-63.
25. Zhao, Q.L., Fujiwara, Y., and Kondo, T. (2006) *Free Radical Biology & Medicine* 1131-1143.
26. Goldbaum, O., and Richter-Landsberg, C. (2002) *Glia* **40**, 271-82.
27. Binder, L.I., Frankfurter, A., and Rebhun, L.I. (1986) *J Cell Biol* **101**, 1371-1378.
28. Shanavas, A., and Papasozomenos, S.C. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14139-44.
29. Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995) *Mol Biol Cell* **6**, 1887-1902.30.
30. Yoshimura, Y., Ichinose, T., and Yamauchi, T. (2003) *Neurosci Lett* **353**, 185-188.
31. Lijima-Ando, K., Zhao, L., Gatt, A., Shenton, C. and Lijima, K. (2010) *Hum Mol Genet* **19**, 1930-1938.
32. Greenwood, A., and Johnson, G.V.W. (1995) *Exp Cell Res* **220**, 332-337.
33. Hua, Q., and He, R.Q. (2002) *Prot Pept Lett* **9**, 349-357.
34. Merk, O., and Speit, G. (1999) *Env and Mol Mut* **33**, 167-172.
35. Terry, L.J., Shows, E.B. and Wentz, S.R. (2007) *Science* **318**, 1412-1416.
36. Crampton, N., Kodiha, M., Shrivastava, S., Umar, R., and Stochaj, U. (2009) *Mol Biol Cell* **20**, 5106-5116.
37. Mutoh, S., Osabe, M., Inoue, K., Moore, R., Pedersen, L., Perera, L., Reboloso, Y., Sueyoshi, T., and Negishi M. (2009) *J Biol Chem* **284**, 34785-92.
38. Daniel, S., Bradley, G., Longshaw, V., Söti, C., Csermely, P., and Blatch G.L. (2008) *BBA* **1783**, 1003-1014.
39. Kodiha, M., Chu, A., Lazrak, O., and Stocha, U. (2005) *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C1034-C1041.
40. Xu, S., Zhou, M., Yu, S., Cai, Y., Zhang, A., Uéda, K., and Chan, P. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 330-335.
41. Karuppagounder, S.S., Xu, H., Pechman, D., Chen, L.H., DeGiorgio, L.A., and Gibson, G.E. (2008) *Neurochem Res* **33**, 1365-1372.
42. Nakaya, T., Kawai, T., and Suzuki, T. (2008) *J Biol Chem* **283**, 19119-19131.
43. Reina, C.P., Zhong, X., and Pittman, R.N. (2010) *Hum Mol Genet* **19**, 235-49.
44. Barzilai, A., Biton, S., and Shiloh, Y. (2008) *DNA repair* **7**, 1010-1027.
45. Roque, A., Orrego, M., Ponte, I., and Suau, P. (2004) *Nuc Ac Res* **32**, 6111-6119.
46. Giavara, S., Kosmidou, E., Hande, M.P., Bianchi, M.E., Morgan, A., d'Adda di Fagagna, F., and Jackson, S.P. (2006) *Curr Biol* **15**, 66-72.
47. Setlow, P. (2007) *TRENDS Microbiol* **15**, 172-180.
48. Lee, K.S., Bumbaca, D., Kosman, J., Setlow, P. and Jedrzejewski, M.J. (2008) *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 2806-2811.
49. Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984) *J Biol Chem* **259**, 12241-12245.
50. Coppédé, F., and Migliore, L. (2009) *Curr Alz Res* **6**, 36-47.
51. Rutten, B.P.F., Schmitz, C., Gerlach, O.H.H., Oyen, H.M., Bueno de Mesquita, E., Steinbusch, H.W.M., and Korr, H. (2007) *Neurobiol Aging* **28**, 91-98.

FOOT NOTES

We thank Pr. Joris Winderickx for fruitful discussions. We thank Dr. Marie-Laure Caillet for helpful suggestions. We are grateful to Hélène Tran, Katia Lecolle, Elodie Marciniak for technical assistance and Meryem Tardivel for confocal microscopy assistance. We are grateful to the IMPRT (Institut de Médecine Pr edictive et de Recherche Th erapeutique, Lille) for access to the electron microscopy platform (AL) and the confocal microscopy platform. This work was supported by Inserm, CNRS, IMPRT, University Lille 2, Région Nord/Pas-de-Calais, FEDER, DN2M and grants from ANR-08-MNPS002/AMYTOXTAU and from the European Community : MEMOSAD (FP7 contract200611). Author contribution: MCG, EB, FN MC and LB designed research. AS, FN, MV, SB, AL, ST, ZM, SH, MC, EB and MCG performed research. AS, FN, EB, LB and MCG analyzed the data. DM, NS contributed new reagents/materials/analysis. MCG wrote the paper. The authors have declared that no competing interests exist.

The abbreviations used are : HS, heat stress; AD, OTM, Olive tail moment; ChIP, chromatin immunoprecipitation ; SYP, synaptophysin.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Cellular distribution of Tau in stress-treated cortical neurons. Western blot analysis of Tau expression in primary neuronal cultures of mouse embryonic cortex using an anti-total Tau antibody recognizing the C terminal Tau sequence (TauCTer) and anti-unphospho Tau (Tau1) antibodies. Cortical cultures were maintained at 37 C (C), treated with H₂O₂ (A) or heated to 44 C (HS) (B) for 1h. Cells were subjected to cellular fractionation as described in the Material and Methods. Distribution of Tau was analyzed in cytosolic and nuclear fractions. H₂O₂ and HS increased the nuclear Tau level in cultured neurons. Densitometric analysis of Western blot using anti-total Tau antibody. Synaptophysin and Lamin B were respectively used as specific markers of the cytoplasmic and the nuclear fractions. Results are expressed as a percentage of the control. Data shown are the mean \pm SD of four different experiments from separate.

FIGURE 2. Effect stress treatments on the LDH level in neuronal cultures. The influence of 1 mM H₂O₂ and Heat Stress (HS) for 1 hour or after 24H or 48H recovery at 37 C on the LDH level was measured in cultured cortical neurons. H₂O₂ but not HS induced LDH leakage in medium 24h after treatment.

FIGURE 3. Transient nuclear accumulation of Tau in Heat Stress-treated neurons. (A) WB analysis using phospho-independent (anti-TauCTer) and dephospho-Tau (Tau1) antibodies. Cortical cultures were heated to 44 C (HS) or kept at 37 C (C) for 1h and then maintained at 37 C for 24 h. Total Tau and dephosphorylated Tau labeling were analyzed both in cytosolic and nuclear fractions. A loss of nuclear Tau staining was observed 24 h after HS. (B) Densitometric analysis of WB using anti-total Tau antibody. Results are expressed as percentage of the control. Data shown are the mean \pm SD of three different experiments. ***p=0.0001, *p<0.05.

FIGURE 4. Heat Stress modulates Tau phosphorylation in cortical neurons. (A) Representative Western blot analysis using anti-total Tau antibody (TauCTer) and phospho-dependent (Tau1, PT212, AT180, 12E8, AD2). Cortical cultures were untreated or treated with HS. Tau phosphorylation at various epitopes was analyzed both in cytosolic and nuclear fractions. In the cytosol, HS induced dephosphorylation. In nuclei from HS-treated neurons, Tau accumulated in the nucleoplasm was in a dephosphorylated state. (B) Representative Western blot analysis using anti-total Tau antibody (anti-TauCTer) and phospho-dependent antibodies (Tau1, PT212, AT180, 12E8, AD2) in brain slices from adult mouse cortex. Cortical slices were untreated or treated with HS. In adult neurons, HS induced nuclear dephosphorylation of all Tau epitopes except for Ser262-356 (12E8).

FIGURE 5. Confocal microscopy analysis of Tau localization in cultured neurons. (A) Immunofluorescence staining of total Tau (Tau3R) in cortical neuronal cultures. Tau3R antibody specifically recognizes Tau isoforms presenting three repeat domains, this being the case of the embryonic Tau isoform, independantly of their phosphorylation state. Immunolabeling of Tau and DAPI nuclear counterstaining were analyzed by confocal laser scanning microscopy. HS strongly increased Tau staining in neuronal nuclei. Scale bars indicate 20 μm . (B) Immunofluorescence staining of total Tau (TauC17). Cells were permeabilized before ice cold méthanol fixation in order to only visualize nuclear bound Tau. Arrowheads indicate neuronal nuclei. Nuclear fluorescence was analyzed by confocal laser scanning microscopy. (C) Immunofluorescence staining of unphospho-Tau (Ser195-202) using Tau1 antibody in cortical culture of neurons. Immunolabeling of Tau1 and ToPro3 nuclear counterstaining were analyzed by confocal laser scanning microscopy. Heat shock strongly increased Tau1 staining in neuronal cytosol and nucleus. Scale bars indicate 10 μm .

FIGURE 6. Electron microscopy analysis of Tau localization in cultured neurons. Immunogold electron microscopy of total Tau (Tau5 antibody) in primary neuronal cultures of mouse embryo cortex. M : mitochondria, C : cytosol, N : nucleus, Nu : nucleolus, f : fibrillar area , g : granular area, NEv : nuclear envelope. Stars indicate Tau staining. Scale bars indicate 10 μm .

FIGURE 7. Interaction of nuclear Tau with genomic DNA is enhanced after HS treatment. Equal amounts (20 μg or 10 μg) of genomic DNA from control (C) and heat-shocked (HS) primary cultured neurons were immunoprecipitated with Tau1 antibody or an antibody directed against the viral non-structural NSs protein (anti-NSs used here as a negative control). Immunoprecipitated and input DNA (corresponding to non-immunoprecipitated genomic DNA) as well as pBR322/AluI DNA were 5'-end ^{32}P -radioactively labeled and submitted to non-denaturing electrophoresis. Tau interacted with DNA a dose-dependent manner. HS increased Tau-DNA interaction. Data shown are representative from three independent experiments using separate cultures.

FIGURE 8. (A) Netropsin modulates HS-induced nuclear Tau accumulation. Western blot analysis of effects of netropsin on Tau, Hsc70 and Lamin B expression in the nuclear fraction using, respectively, anti-total Tau (TauCTer), anti-Hsc70 and anti-Lamin B antibodies. (B) Densitometric analysis of western blot using an anti-total Tau (TauCTer) antibody. Results are expressed as a percentage of the control. Data shown are the mean \pm SD of three different experiments. * $p < 0.05$.

FIGURE 9. Heat Stress selectively impairs DNA integrity in Tau-deficient neuronal cultures. The effect of HS on DNA from wild type (Tau+/+) or Tau-deficient cells (Tau-/-) was measured by Comet assay. Results are presented as the Olive tail moment (OTM) ratio from heat-shocked cells (HS) over control (C). Each OTM value is a median value from 150 to 200 cells. Data shown are the means from three different experiments using separate cultures. ** $p < 0.01$.

FIGURE 10. Heat Stress-induced DNA damage induced in Tau-deficient neurons is prevented by hTau-NLS or hTau overexpression. (A) WB analysis using a specific antibody raised against human Tau (HT7). Tau-deficient cortical cultures were infected for 24 h with adenoviral vectors coding for human Tau (HAdV-5-hTau44Wt) or human Tau-NLS (HAdV-5-hTau44NLS), heated to 44°C (HS) or maintained at 37°C (C) for 1h and subjected to subcellular fractionation. hTau-NLS was specifically expressed in the nuclei independently of temperature treatment. hTau was mostly localized in the cytosolic fraction in the control condition. Nuclear hTau level increased after HS. (B) Comet assay showing the effect of human Tau and human Tau-NLS overexpression in Tau-deficient cells. Data shown are the means \pm SD of 100 cells measured for each condition. ** $p < 0.005$.

FIGURE 11. Tau-mediated DNA protection in postmitotic neurons. Scheme illustrating the nuclear Tau protection of DNA integrity in heat stressed neurons.

TABLE I. Tau deficiency-related DNA damage is not related to cell death. Representative fast halo assay measuring the percentage of apoptotic and necrotic cells from wild-type and Tau-deficient cultures untreated or treated with HS. Apoptotic or necrotic cells were detected in a population of 100

cells. $p < 0.001$.

Figure 1

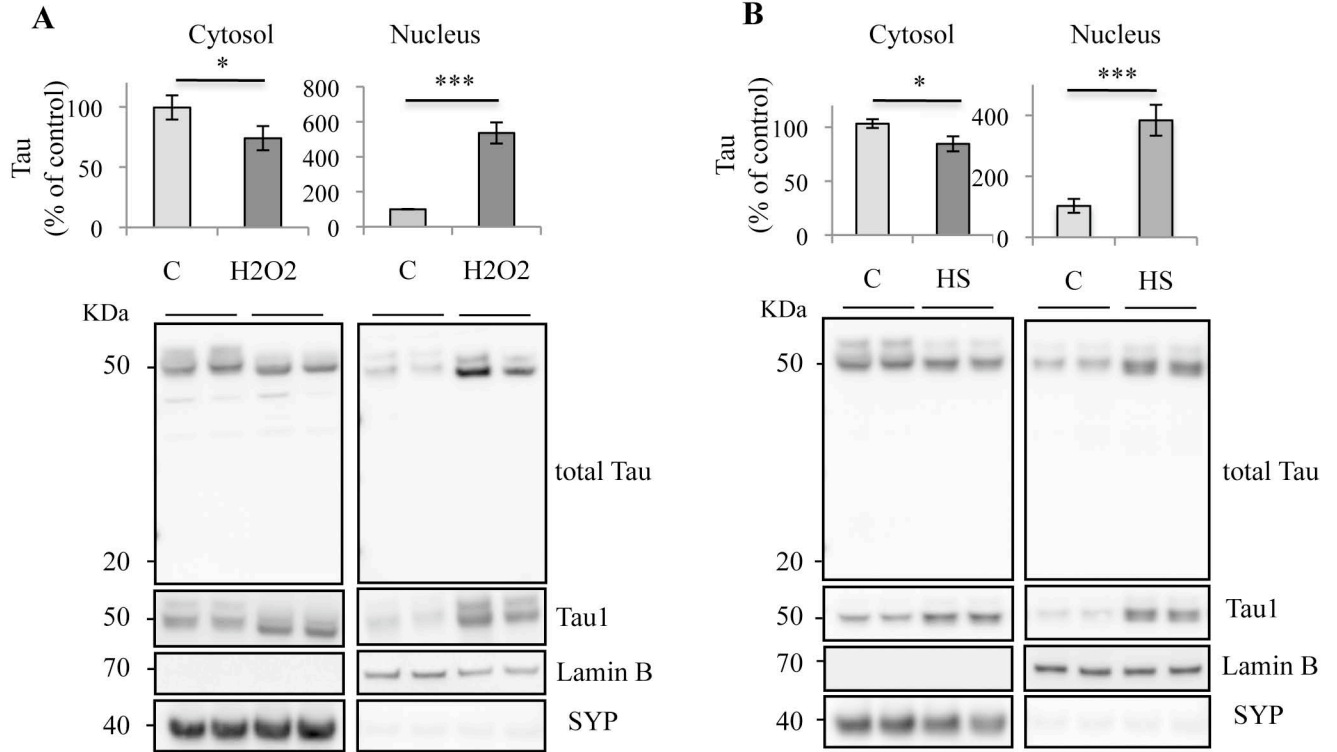


Figure 2

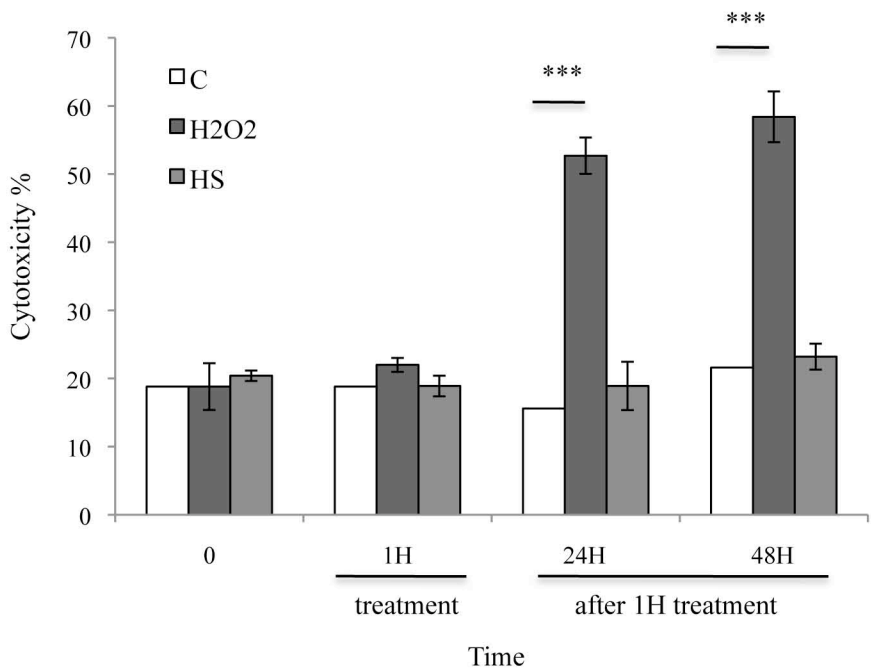


Figure 3

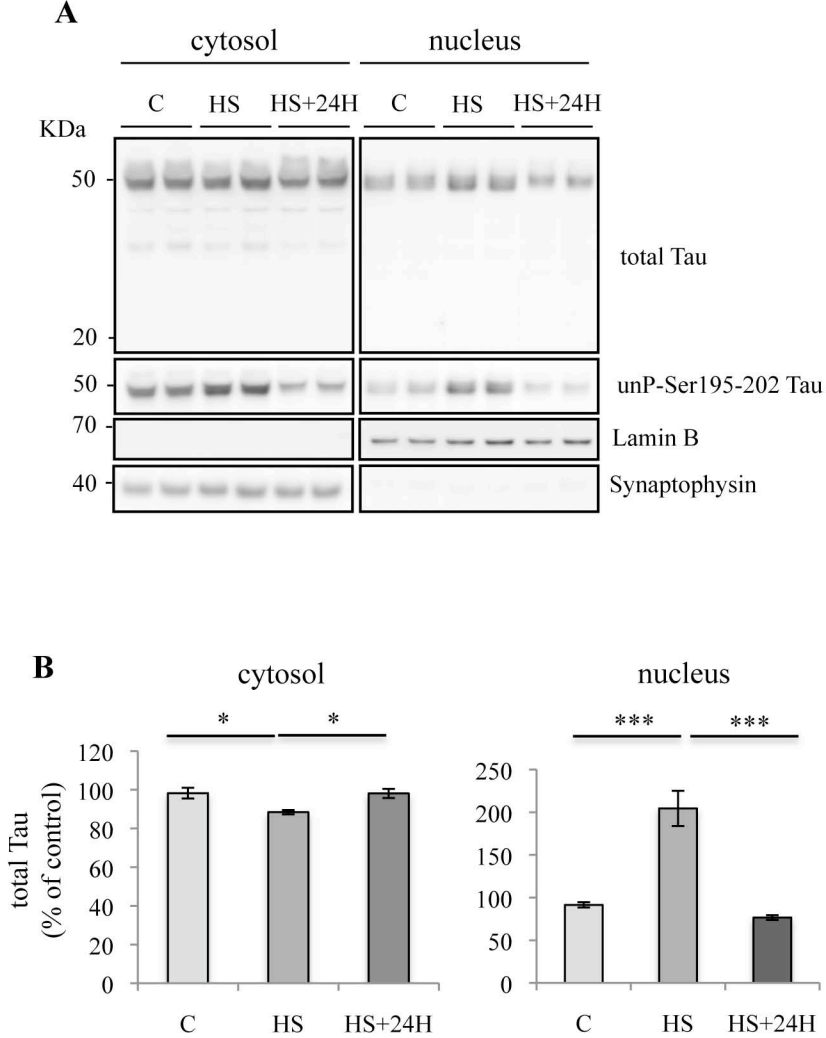


Figure 4

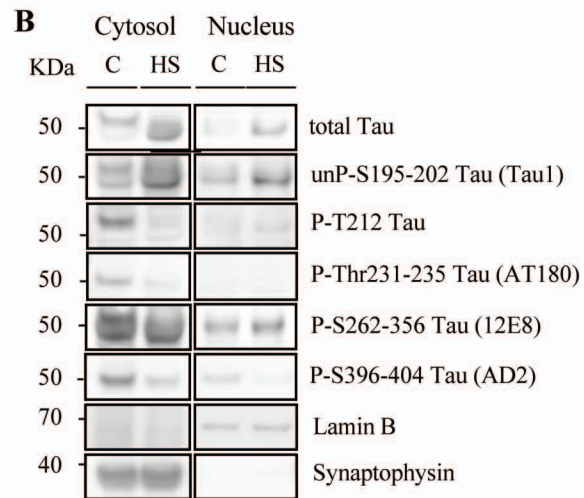
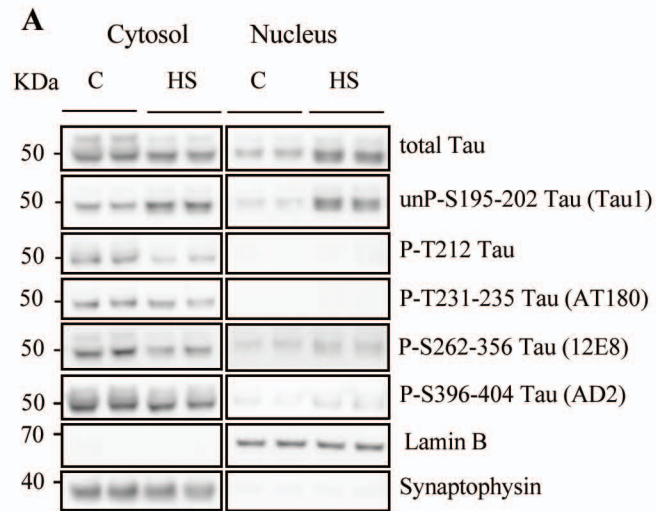


Figure 5

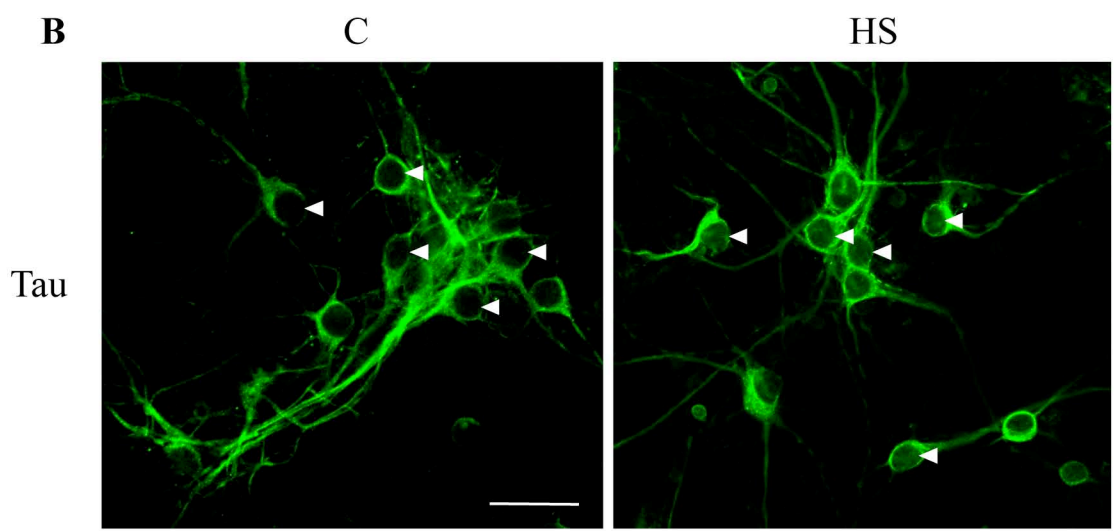
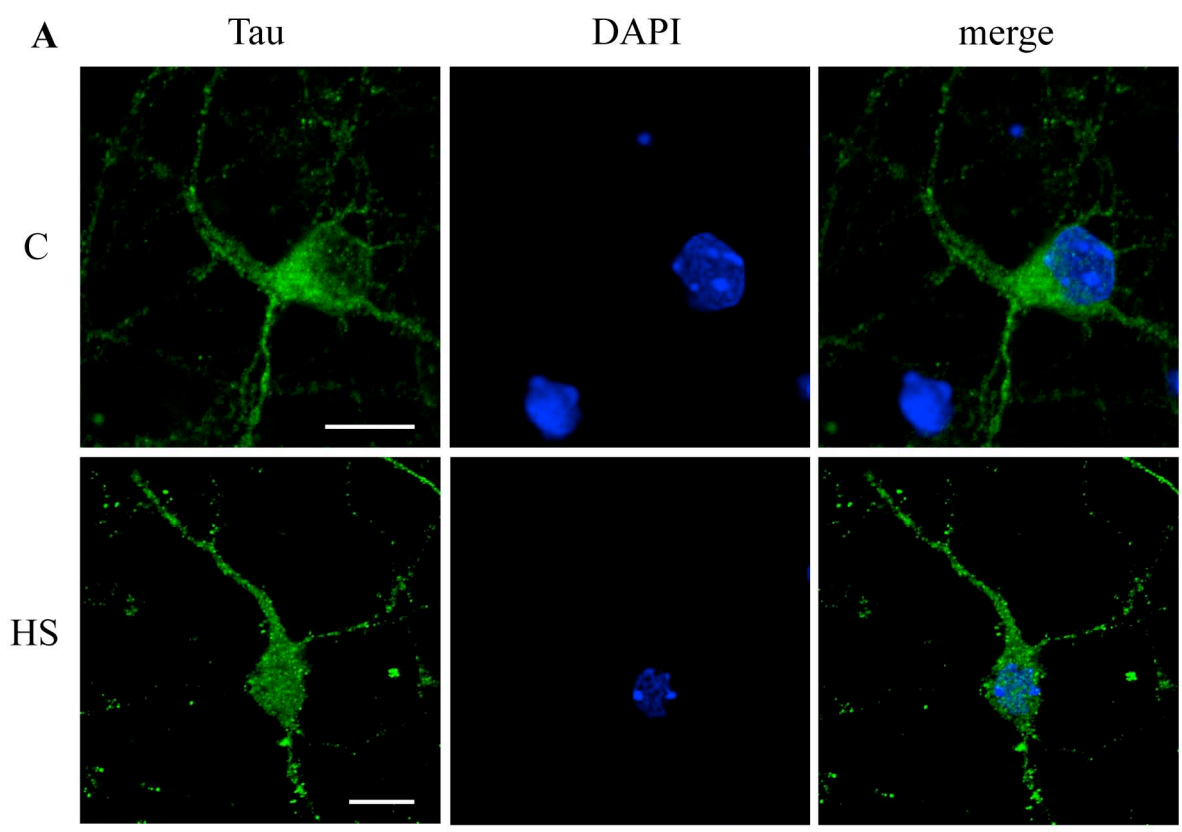


Figure 5

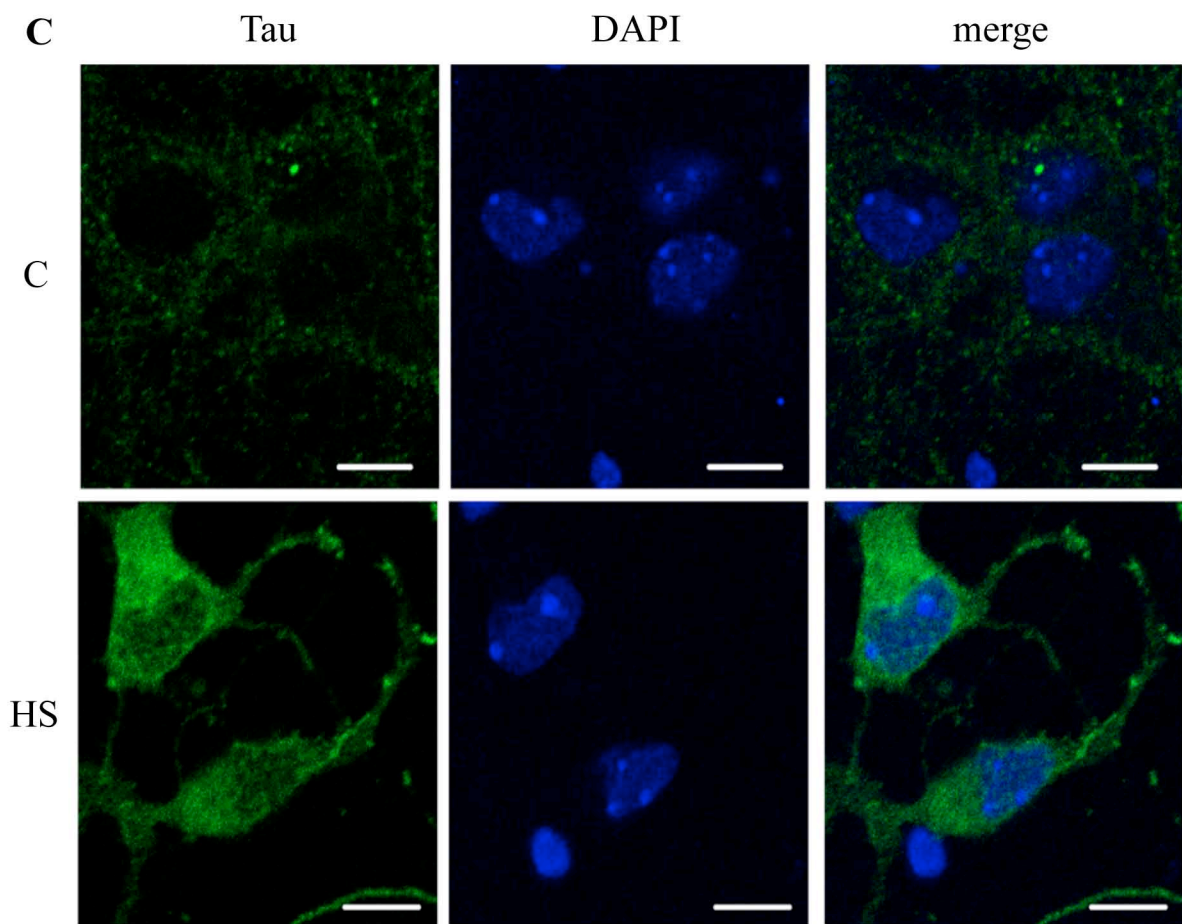


Figure 6

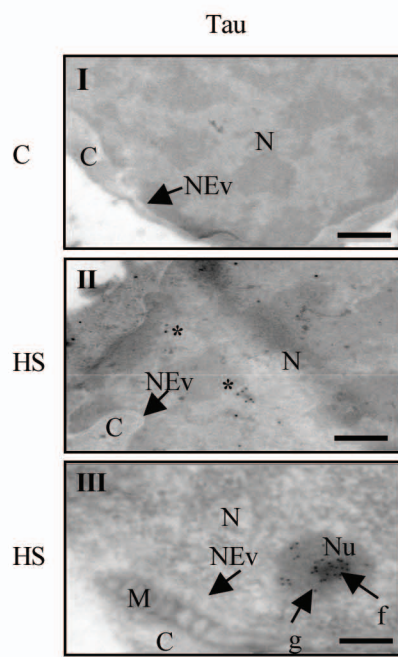


Figure 7

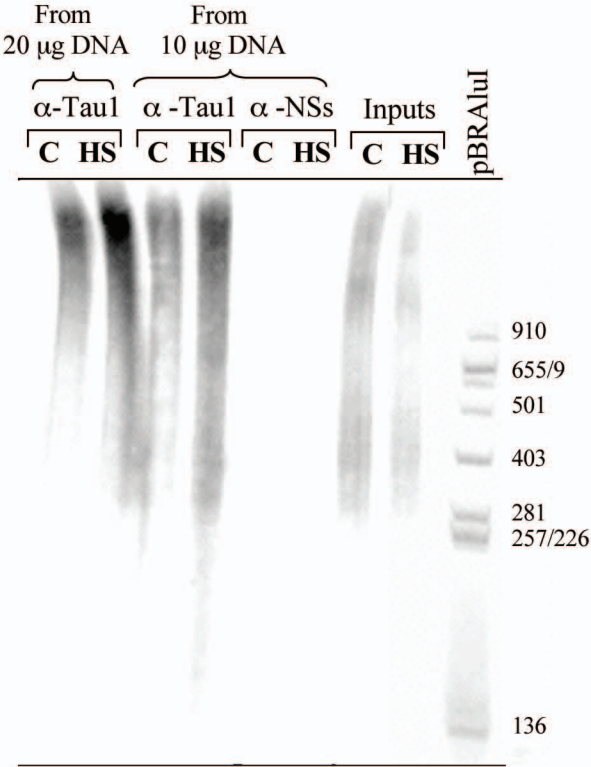


Figure 8

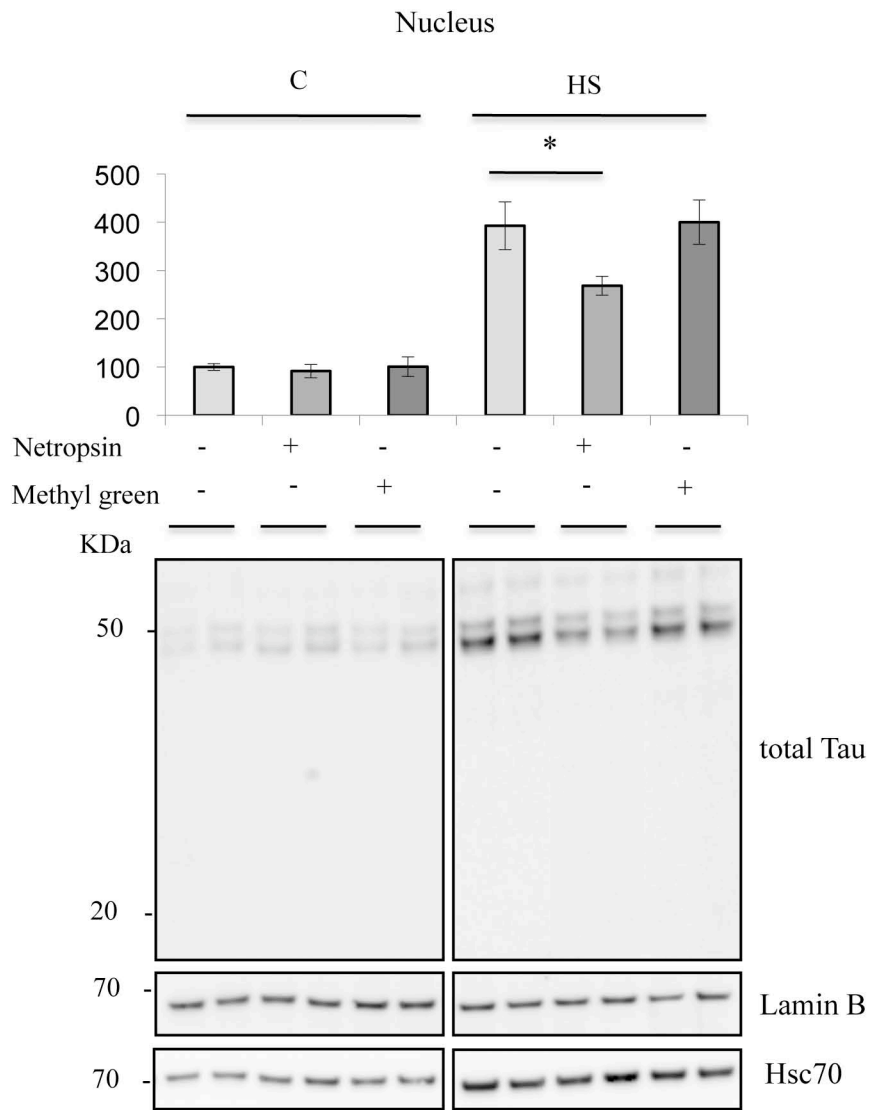


Figure 9

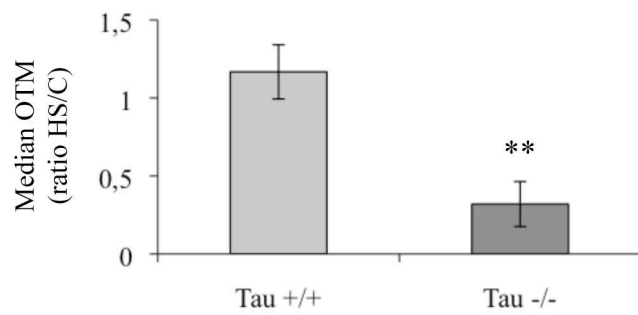


Figure 10

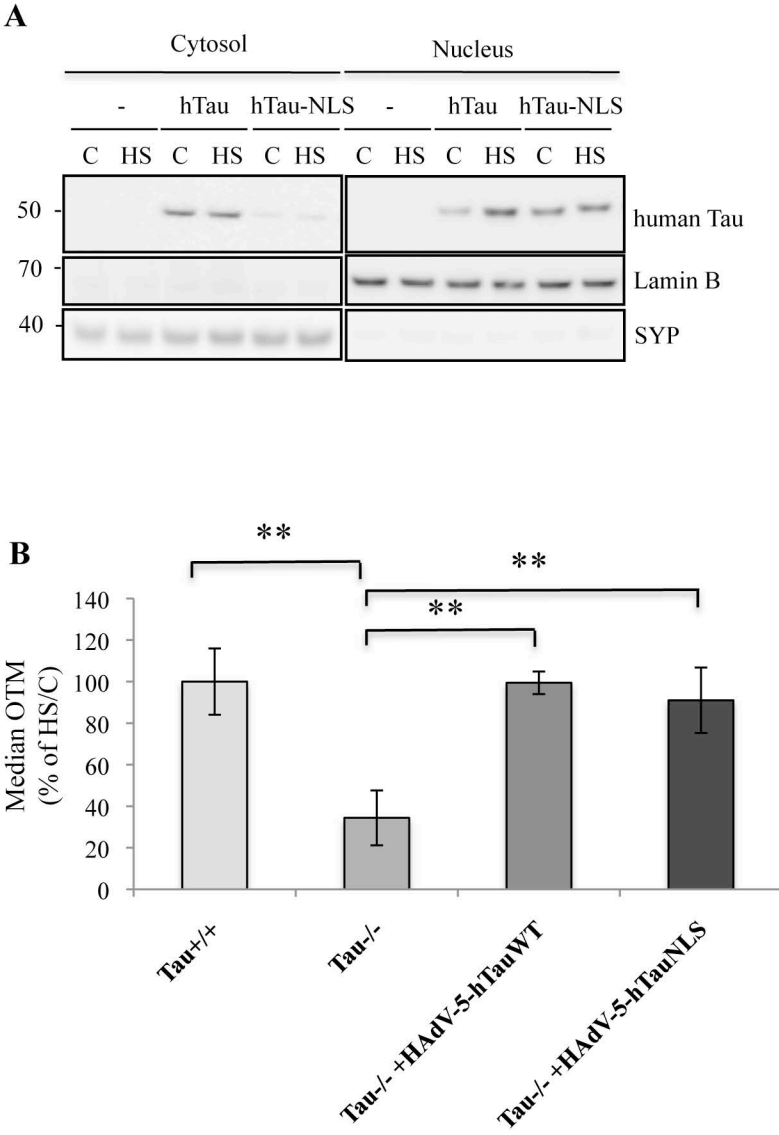


Figure 11

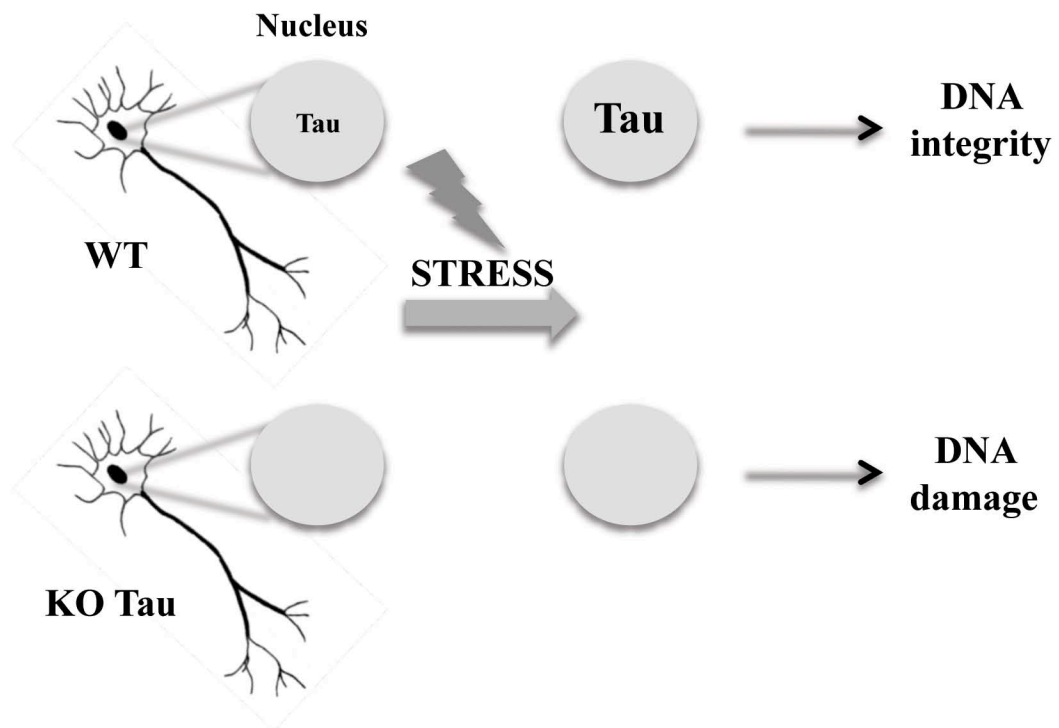


Table 1

	Apoptotic cells	Necrotic cells
	Ratio HS/C	
Tau +/+	0.66	1.01
Tau -/-	1.05	1.10

BindN prediction of DNA-binding residues

Summary

Your sequence: sp|P10636-8|TAU_HUMAN Isoform Tau-4 of Microtubule-associated protein tau OS=Homo sapiens GN=MAPT

Input sequence length: 441 amino acids

Predicted binding sites: 147 residues

User-defined specificity: 80.00%

Estimated sensitivity: 56.96%

Overview

Sequence: MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSEEPG
 Prediction: -----+-----+-----++-----+-----+-----+-----
 Confidence: 574646799999959724544656424522434887983886843525223634735455

Sequence: SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHT EIP EGT TAE EAG IGDTP SLEDEAAG
 Prediction: +-+++-+++--+-----+-----++-----+-----+-----+-----
 Confidence: 436753755247459298999879556456526335753822657997642538978988

Sequence: HVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGOANATRI PAKTP P PAK
 Prediction: ---+-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 Confidence: 364539256868535462356654325758338395445342846344794435825328

Sequence: TPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSR SRTPSLPTPPTREP KKVAVVRT PPKSPSSAK
 Prediction: +++++-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 Confidence: 866782422572297278884854976998996922922794354565685538969929

Sequence: SRLQTAPVMPDLK NVKSKIGSTENLKH QPGGK VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
 Prediction: +-+-+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 Confidence: 79358748656675465673277226223546674564347574473562368328338

Sequence: PGGGSVQIVYKPV DLSKVT SKCGSLGNIH HKPGGGQVEVKSEK LDFKDRVQSKIGSLDNI
 Prediction: -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----
 Confidence: 455666257234854795677325663853536572727545477525772725426649

Sequence: THVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPV VSGDTS PRHLSNV SSTGSIDMV
 Prediction: -----++-+-+--+
 Confidence: 348464426953625742825565584488777254247523554944854757348869

Sequence: DSPQLATLADEV SASLAKQGL
 Prediction: -----+-----+-----
 Confidence: 926398388659452557367

*** Prediction: binding residues are labeled with '+' and in red; non-binding residues labeled with '-' and in green.
 *** Confidence: from level 0 (lowest) to level 9 (highest).

Details

<u>Position</u>	<u>Residue</u>	<u>SVM Output</u>	<u>Prediction*</u>	<u>Confidence**</u>
1	M	-0.6034	-	0.5131
2	A	-1.1052	-	0.7452
3	E	-0.4262	-	0.4369
4	P	-0.9774	-	0.6823
5	R	0.5335	+	0.4931
6	Q	-0.8462	-	0.6191
7	E	-1.0572	-	0.7200
8	F	-1.5745	-	0.9212
9	E	-1.6820	-	0.9472
10	V	-2.1632	-	0.9903
11	M	-1.8088	-	0.9700
12	E	-1.7193	-	0.9536
13	D	-1.5711	-	0.9208
14	H	-0.7701	-	0.5834
15	A	-1.5388	-	0.9123
16	G	-1.1358	-	0.7578
17	T	0.2844	-	0.2236
18	Y	0.4408	+	0.4507
19	G	-0.7818	-	0.5881
20	L	-0.4413	-	0.4436
21	G	-0.4025	-	0.4273
22	D	-1.0010	-	0.6948
23	R	0.6905	+	0.5604
24	K	0.7712	+	0.6055
25	D	-0.4248	-	0.4361
26	Q	0.2937	-	0.2214
27	G	-0.4176	-	0.4328
28	G	-0.6426	-	0.5269
29	Y	0.3224	-	0.2142
30	T	0.3536	-	0.2058
31	M	-0.3656	-	0.4147
32	H	-0.1675	-	0.3459
33	Q	-0.3996	-	0.4262
34	D	-1.4230	-	0.8747
35	Q	-1.2534	-	0.8080
36	E	-1.0705	-	0.7281
37	G	-1.5867	-	0.9239
38	D	-1.3630	-	0.8514
39	T	-0.2707	-	0.3825
40	D	-1.3040	-	0.8269
41	A	-1.2766	-	0.8161
42	G	-0.9865	-	0.6864
43	L	-1.2890	-	0.8208
44	K	0.3939	+	0.4350
45	E	-0.2340	-	0.3673
46	S	0.5973	+	0.5189
47	P	0.2388	-	0.2328
48	L	-0.7018	-	0.5523
49	Q	0.0330	-	0.2866
50	T	0.0683	-	0.2775
51	P	-0.2478	-	0.3731
52	T	0.8456	+	0.6525
53	E	-0.0877	-	0.3197
54	D	-0.4522	-	0.4494
55	G	-1.2224	-	0.7953
56	S	-0.1175	-	0.3305
57	E	-0.6321	-	0.5220
58	E	-0.4745	-	0.4592
59	P	-0.5932	-	0.5097
60	G	-0.6721	-	0.5392
61	S	0.4639	+	0.4590
62	E	-0.0575	-	0.3127

63	T	0.7663	+	0.6018
64	S	0.9663	+	0.7060
65	D	0.6241	+	0.5290
66	A	-0.0891	-	0.3206
67	K	1.0146	+	0.7373
68	S	0.7472	+	0.5908
69	T	0.7136	+	0.5751
70	P	0.2002	-	0.2439
71	T	0.5129	+	0.4839
72	A	-1.0494	-	0.7167
73	E	-0.3938	-	0.4239
74	D	-0.6967	-	0.5500
75	V	-1.5796	-	0.9223
76	T	0.0736	-	0.2758
77	A	-1.5701	-	0.9202
78	P	-1.3327	-	0.8403
79	L	-1.7668	-	0.9630
80	V	-1.7942	-	0.9669
81	D	-1.7276	-	0.9550
82	E	-1.2527	-	0.8075
83	G	-1.1962	-	0.7836
84	A	-1.5700	-	0.9200
85	P	-0.6141	-	0.5164
86	G	-0.6751	-	0.5409
87	K	0.8804	+	0.6664
88	Q	0.4737	+	0.4618
89	A	-0.6643	-	0.5358
90	A	-0.8400	-	0.6159
91	A	-0.8004	-	0.5975
92	Q	0.0396	-	0.2841
93	P	-0.9159	-	0.6503
94	H	-0.2637	-	0.3792
95	T	-0.1933	-	0.3545
96	E	-0.6369	-	0.5245
97	I	-1.0454	-	0.7148
98	P	-0.5913	-	0.5095
99	E	-0.3119	-	0.3962
100	G	-1.3960	-	0.8647
101	T	0.0462	-	0.2823
102	T	0.2661	-	0.2283
103	A	-0.8524	-	0.6211
104	E	-0.7947	-	0.5948
105	E	-1.0318	-	0.7083
106	A	-1.6981	-	0.9502
107	G	-1.7603	-	0.9616
108	I	-1.1645	-	0.7684
109	G	-1.0094	-	0.6994
110	D	-0.5122	-	0.4745
111	T	0.0563	-	0.2797
112	P	-0.7108	-	0.5552
113	S	-0.1462	-	0.3387
114	L	-1.2385	-	0.8019
115	E	-1.5558	-	0.9172
116	D	-1.1965	-	0.7836
117	E	-1.4657	-	0.8897
118	A	-1.8587	-	0.9777
119	A	-1.3723	-	0.8561
120	G	-1.2641	-	0.8117
121	H	-0.1220	-	0.3322
122	V	-0.8512	-	0.6209
123	T	0.4942	+	0.4756
124	Q	0.7012	+	0.5641
125	A	-0.2642	-	0.3800
126	R	1.9166	+	0.9788
127	M	0.0571	-	0.2791

128	V	-0.5860	-	0.5077
129	S	0.8261	+	0.6341
130	K	1.3919	+	0.8876
131	S	0.9276	+	0.6931
132	K	1.3822	+	0.8866
133	D	0.6322	+	0.5355
134	G	-0.1951	-	0.3552
135	T	0.7186	+	0.5770
136	G	-0.3952	-	0.4245
137	S	0.8294	+	0.6359
138	D	0.1160	-	0.2650
139	D	-0.2944	-	0.3892
140	K	0.6732	+	0.5530
141	K	0.8340	+	0.6406
142	A	-0.9141	-	0.6500
143	K	0.5748	+	0.5069
144	G	-0.3796	-	0.4191
145	A	-0.3000	-	0.3914
146	D	-0.0100	-	0.2981
147	G	-0.6714	-	0.5387
148	K	0.9790	+	0.7161
149	T	0.6486	+	0.5419
150	K	1.2888	+	0.8645
151	I	-0.2981	-	0.3908
152	A	-0.2666	-	0.3809
153	T	1.2031	+	0.8369
154	P	-0.2953	-	0.3898
155	R	1.6951	+	0.9539
156	G	-0.5708	-	0.5011
157	A	-0.3556	-	0.4109
158	A	-0.4996	-	0.4711
159	P	-0.5841	-	0.5072
160	P	-0.0878	-	0.3197
161	G	-0.3855	-	0.4212
162	Q	0.3376	-	0.2102
163	K	1.2206	+	0.8424
164	G	-0.3671	-	0.4155
165	Q	0.9146	+	0.6885
166	A	-0.3168	-	0.3975
167	N	0.4469	+	0.4525
168	A	-0.5494	-	0.4911
169	T	1.0852	+	0.7714
170	R	1.8837	+	0.9751
171	I	-0.3303	-	0.4023
172	P	0.4842	+	0.4682
173	A	-0.3085	-	0.3948
174	K	0.6899	+	0.5604
175	T	1.2349	+	0.8461
176	P	0.3717	-	0.2005
177	P	0.6705	+	0.5521
178	A	-0.1316	-	0.3344
179	P	0.2243	-	0.2369
180	K	1.3449	+	0.8829
181	T	1.4000	+	0.8903
182	P	0.9012	+	0.6783
183	P	0.8019	+	0.6240
184	S	1.0849	+	0.7714
185	S	1.1498	+	0.8065
186	G	0.2171	-	0.2383
187	E	0.4251	+	0.4442
188	P	0.2580	-	0.2291
189	P	0.0042	-	0.2942
190	K	0.6420	+	0.5392
191	S	0.9715	+	0.7088
192	G	0.3117	-	0.2175

193	D	0.1083	-	0.2677
194	R	1.6055	+	0.9401
195	S	1.0445	+	0.7530
196	G	0.1656	-	0.2533
197	Y	1.1151	+	0.7862
198	S	1.2461	+	0.8498
199	S	1.1774	+	0.8230
200	P	1.1657	+	0.8184
201	G	0.3964	+	0.4350
202	S	1.2047	+	0.8387
203	P	0.7371	+	0.5889
204	G	0.3740	+	0.4304
205	T	1.6617	+	0.9493
206	P	1.0339	+	0.7447
207	G	0.8372	+	0.6415
208	S	1.5066	+	0.9235
209	R	2.4845	+	0.9862
210	S	1.1399	+	0.8009
211	R	2.3622	+	0.9862
212	T	1.4740	+	0.9134
213	P	0.9324	+	0.6949
214	S	1.6547	+	0.9484
215	L	0.0585	-	0.2789
216	P	0.2151	-	0.2387
217	T	1.4460	+	0.9041
218	P	0.3492	-	0.2069
219	P	0.2557	-	0.2294
220	T	1.0394	+	0.7484
221	R	1.4728	+	0.9134
222	E	0.3788	+	0.4323
223	P	-0.2093	-	0.3598
224	K	0.5986	+	0.5189
225	K	0.4467	+	0.4525
226	V	-0.6472	-	0.5286
227	A	-0.8099	-	0.6031
228	V	-0.6208	-	0.5181
229	V	-0.8680	-	0.6273
230	R	1.3671	+	0.8848
231	T	0.5734	+	0.5069
232	P	0.6464	+	0.5419
233	P	-0.1616	-	0.3428
234	K	1.2997	+	0.8691
235	S	1.5270	+	0.9290
236	P	0.9268	+	0.6931
237	S	1.6114	+	0.9419
238	S	1.5715	+	0.9355
239	A	0.1592	-	0.2548
240	K	1.7701	+	0.9631
241	S	1.1076	+	0.7797
242	R	1.8351	+	0.9687
243	L	-0.1167	-	0.3303
244	Q	0.6160	+	0.5272
245	T	1.1448	+	0.8046
246	A	-1.1302	-	0.7561
247	P	-0.4751	-	0.4598
248	V	-1.2462	-	0.8050
249	P	-0.9473	-	0.6662
250	M	-0.5743	-	0.5033
251	P	-0.8083	-	0.6020
252	D	-0.8155	-	0.6064
253	L	-1.0558	-	0.7192
254	K	0.6810	+	0.5576
255	N	0.4833	+	0.4682
256	V	-0.9728	-	0.6806
257	K	0.6457	+	0.5410

258	S	0.8210	+	0.6332
259	K	1.0902	+	0.7742
260	I	-0.0890	-	0.3203
261	G	0.0310	-	0.2867
262	S	0.9769	+	0.7134
263	T	0.9518	+	0.7014
264	E	0.3577	-	0.2052
265	N	0.3379	-	0.2102
266	L	-0.9543	-	0.6706
267	K	0.3500	-	0.2066
268	H	0.1142	-	0.2656
269	Q	0.0843	-	0.2734
270	P	-0.1243	-	0.3328
271	G	-0.7264	-	0.5609
272	G	-0.3938	-	0.4239
273	G	-0.8066	-	0.6006
274	K	0.7862	+	0.6147
275	V	-1.1958	-	0.7834
276	Q	0.3741	+	0.4304
277	I	-0.7411	-	0.5692
278	I	-0.9992	-	0.6937
279	N	-0.3781	-	0.4186
280	K	-0.2174	-	0.3630
281	K	0.5264	+	0.4885
282	L	-1.2142	-	0.7914
283	D	-0.7220	-	0.5591
284	L	-1.0407	-	0.7122
285	S	0.5157	+	0.4848
286	N	0.5424	+	0.4977
287	V	-1.1439	-	0.7600
288	Q	-0.0521	-	0.3114
289	S	0.6564	+	0.5475
290	K	0.9053	+	0.6811
291	C	0.2905	-	0.2225
292	G	-0.2208	-	0.3642
293	S	0.8557	+	0.6562
294	K	1.2087	+	0.8406
295	D	-0.1970	-	0.3559
296	N	0.0045	-	0.2942
297	I	-1.4423	-	0.8823
298	K	-0.0228	-	0.3019
299	H	-0.2196	-	0.3639
300	V	-1.2526	-	0.8075
301	P	-0.5564	-	0.4936
302	G	-0.8044	-	0.5994
303	G	-0.6089	-	0.5147
304	G	-0.9263	-	0.6564
305	S	0.8599	+	0.6571
306	V	-0.8742	-	0.6316
307	Q	0.3552	-	0.2055
308	I	-0.7169	-	0.5570
309	V	-1.1252	-	0.7539
310	Y	0.0881	-	0.2723
311	K	-0.1550	-	0.3423
312	P	-0.3440	-	0.4066
313	V	-1.2494	-	0.8059
314	D	-0.5731	-	0.5030
315	L	-0.5027	-	0.4720
316	S	1.0883	+	0.7733
317	K	1.4263	+	0.9005
318	V	-0.7559	-	0.5759
319	T	0.8048	+	0.6267
320	S	1.0661	+	0.7613
321	K	1.0346	+	0.7447
322	C	-0.0756	-	0.3169

323	G	0.1139	-	0.2661
324	S	0.7446	+	0.5889
325	L	-0.9250	-	0.6553
326	G	-0.8704	-	0.6287
327	N	-0.1096	-	0.3284
328	I	-1.3911	-	0.8639
329	H	-0.5726	-	0.5027
330	H	-0.2338	-	0.3673
331	K	0.6133	+	0.5263
332	P	-0.2195	-	0.3639
333	G	-0.9891	-	0.6887
334	G	-0.7797	-	0.5873
335	G	-1.0485	-	0.7166
336	Q	0.1644	-	0.2534
337	V	-1.1493	-	0.7631
338	E	0.0221	-	0.2894
339	V	-1.0898	-	0.7372
340	K	0.5605	+	0.5041
341	S	0.3877	+	0.4341
342	E	-0.6012	-	0.5123
343	K	0.5455	+	0.4977
344	L	-1.1774	-	0.7758
345	D	-1.0697	-	0.7278
346	F	-0.6611	-	0.5348
347	K	0.2811	-	0.2241
348	D	-0.6341	-	0.5233
349	R	1.1312	+	0.7935
350	V	-1.1415	-	0.7597
351	Q	0.1007	-	0.2697
352	S	0.9651	+	0.7051
353	K	0.3274	-	0.2122
354	I	-0.6801	-	0.5433
355	G	-0.5193	-	0.4778
356	S	0.2720	-	0.2273
357	L	-0.8580	-	0.6237
358	D	-0.8412	-	0.6167
359	N	-0.5502	-	0.4914
360	I	-1.6403	-	0.9373
361	T	-0.1698	-	0.3466
362	H	-0.3878	-	0.4222
363	V	-1.2568	-	0.8092
364	P	-0.3567	-	0.4111
365	G	-0.9447	-	0.6652
366	G	-0.4522	-	0.4494
367	G	-0.3601	-	0.4125
368	N	0.2156	-	0.2387
369	K	0.7708	+	0.6055
370	K	1.4566	+	0.9088
371	I	-0.6683	-	0.5372
372	E	-0.2556	-	0.3762
373	T	0.9232	+	0.6931
374	H	0.1370	-	0.2603
375	K	0.7216	+	0.5788
376	L	-1.0320	-	0.7089
377	T	0.5518	+	0.4995
378	F	-0.0124	-	0.2986
379	R	1.1763	+	0.8230
380	E	0.2685	-	0.2278
381	N	0.5534	+	0.5005
382	A	-0.7482	-	0.5728
383	K	0.8511	+	0.6553
384	A	-0.7667	-	0.5820
385	K	0.7438	+	0.5889
386	T	1.2256	+	0.8433
387	D	-0.4247	-	0.4361

388	H	-0.3792	-	0.4191
389	G	-1.2514	-	0.8072
390	A	-1.4683	-	0.8908
391	E	-1.0548	-	0.7187
392	I	-1.0628	-	0.7234
393	V	-1.2063	-	0.7875
394	Y	0.2768	-	0.2255
395	K	0.7100	+	0.5724
396	S	0.3778	+	0.4323
397	P	0.0441	-	0.2828
398	V	-0.5236	-	0.4794
399	V	-1.0648	-	0.7247
400	S	0.7448	+	0.5889
401	G	0.1724	-	0.2516
402	D	-0.0550	-	0.3120
403	T	0.6814	+	0.5576
404	S	0.6118	+	0.5263
405	P	0.5082	+	0.4811
406	R	2.1295	+	0.9862
407	H	0.4353	+	0.4498
408	L	-0.3556	-	0.4109
409	S	1.2668	+	0.8535
410	N	0.6643	+	0.5493
411	V	-0.4872	-	0.4661
412	S	0.9848	+	0.7207
413	S	0.6936	+	0.5622
414	T	1.0090	+	0.7364
415	G	-0.3125	-	0.3966
416	S	0.4316	+	0.4470
417	I	-1.3087	-	0.8297
418	D	-1.2657	-	0.8120
419	M	-0.8742	-	0.6316
420	V	-1.6310	-	0.9352
421	D	-1.6963	-	0.9498
422	S	0.1585	-	0.2550
423	P	-0.8601	-	0.6244
424	Q	-0.2506	-	0.3744
425	L	-1.5438	-	0.9136
426	A	-1.3080	-	0.8297
427	T	-0.2619	-	0.3784
428	L	-1.3501	-	0.8466
429	A	-1.4861	-	0.8972
430	D	-0.9217	-	0.6525
431	E	-0.7843	-	0.5892
432	V	-1.9236	-	0.9828
433	S	0.4356	+	0.4498
434	A	-0.7294	-	0.5622
435	S	0.3566	-	0.2055
436	L	-0.6999	-	0.5516
437	A	-0.7588	-	0.5772
438	K	0.9774	+	0.7152
439	Q	-0.0668	-	0.3147
440	G	-0.8329	-	0.6123
441	L	-1.0253	-	0.7056

* The output threshold used for prediction is 0.3725.

** The confidence value is (1 - sensitivity) for positive predictions,
and (1 - specificity) for negative predictions.

1. 1. 3. Conclusion

L'hyperthermie et le stress oxydant induisent une accumulation de Tau déphosphorylée dans le noyau des neurones.

Dans des neurones en cultures ou dans des neurones adultes, un stress hyperthermique induit une déphosphorylation des protéines Tau sur de nombreux sites dans le cytosol.

La déphosphorylation des protéines s'accompagne d'une translocation nucléaire et d'une accumulation réversible de Tau dans le noyau des neurones.

Dans le noyau, les protéines sont majoritairement sous forme déphosphorylée bien que la protéine reste phosphorylée sur les sites Ser 262 et Ser 356. La déphosphorylation de ces sites ne semble donc pas essentielle au transport de la protéine dans le noyau.

Une déphosphorylation (sur les sites Ser 195/198/199/202) et une accumulation nucléaire de Tau sont également observées dans des neurones en cultures suite à un stress oxydant. Ainsi, l'augmentation de la quantité de Tau dans le noyau coïncide avec la déphosphorylation de Tau. Cette corrélation entre phosphorylation et localisation subcellulaire de Tau suggère que la déphosphorylation de Tau sur certains sites pourrait jouer un rôle dans sa localisation nucléaire.

Association de Tau nucléaire avec l'ADN.

La détection de Tau dans le noyau des neurones par microscopie confocale après élimination des protéines solubles suggère que Tau nucléaire se lie à certaines structures insolubles. Nous avons par ailleurs observé une corrélation entre la liaison de Tau à des structures insoluble et son interaction avec l'ADN. L'analyse de la liaison Tau-ADN dans des cultures primaires de neurones corticaux a montré que Tau se lie à l'ADN. De plus, le stress hyperthermique conduit à une augmentation de l'interaction suggérant que lorsque Tau entre dans le compartiment nucléaire, la protéine s'associe à l'ADN. Ces résultats sont en accord avec d'autres études décrivant une liaison de Tau à l'ADN *in vitro* et *in situ* (Hua and He, 2003; Qu *et al.*, 2004; Sjoberg *et al.*, 2006).

Une analyse informatique de la prédiction des résidus de Tau susceptibles de se lier à l'ADN a été réalisée à l'aide du logiciel BindN. Cette analyse indique que certaines régions de Tau, en particulier dans sa région riche en proline, pourraient se lier à l'ADN. Ces données

concordent avec les résultats de travaux réalisés *in vitro* mettant en évidence une implication du domaine riche en proline dans la liaison de Tau à l'ADN. Dans cette étude, la protéine, en se liant spécifiquement au petit sillon de l'ADN, est capable de le protéger de dommages induits par la DNase I ou par les radicaux libres (Wei *et al.*, 2008). Nous avons cherché à savoir si dans notre modèle, Tau se liait de manière spécifique au niveau du petit sillon de l'ADN par un test de compétition entre la nétopisine, une molécule spécifique de séquences A/T riches situées sur le petit sillon, le methyl green et Tau.

Nos résultats suggèrent que la nétopisine entre en compétition avec Tau pour la liaison à l'ADN entraînant une baisse de la liaison Tau-ADN. Les protéines Tau ne se liant pas à l'ADN via le petit sillon ressortiraient alors du noyau des neurones. Cette baisse de la quantité de Tau dans le noyau n'est pas observée en présence de methyl green, un ligand spécifique du grand sillon (Kim and Nordén, 1993) suggérant que Tau se lie spécifiquement au petit sillon riche en A/T de l'ADN.

Néanmoins, une certaine quantité de Tau reste dans le compartiment nucléaire malgré l'augmentation de la concentration en nétopisine suggérant que les protéines Tau pourraient se lier à des séquences autres que des séquences A/T riches situées dans le petit sillon. Par ailleurs, ces résultats restent indirects, une étude complémentaire de la liaison de Tau à l'ADN par CHIP en présence de nétopisine ou methyl green est nécessaire pour pouvoir conclure sur l'implication de ces séquences dans la liaison à Tau à l'ADN.

Tau nucléaire protège l'ADN des dommages induits par l'hyperthermie

Nous avons étudié le rôle protecteur potentiel de Tau vis à vis de l'ADN par la technique de Comet assay en analysant l'intégrité de l'ADN dans des cultures primaires sauvages ou déficientes en Tau en condition de stress hyperthermique.

Le Comet assay est considéré comme la technique la plus sensible pour détecter et quantifier des dommages à l'ADN, comme de la fragmentation ou des pontages, à l'échelle de cellules individualisées (Olive *et al.*, 1990). Son principe repose sur la capacité des fragments d'ADN à migrer dans un gel en condition dénaturante sous l'effet d'un champ électrique. De ce fait, en fonction de la taille des fragments d'ADN, ces derniers migrent plus ou moins rapidement dans le gel ce qui permet, par la suite, de mesurer et différencier les types de dommages (Ashby *et al.*, 1995) (Figure 16).

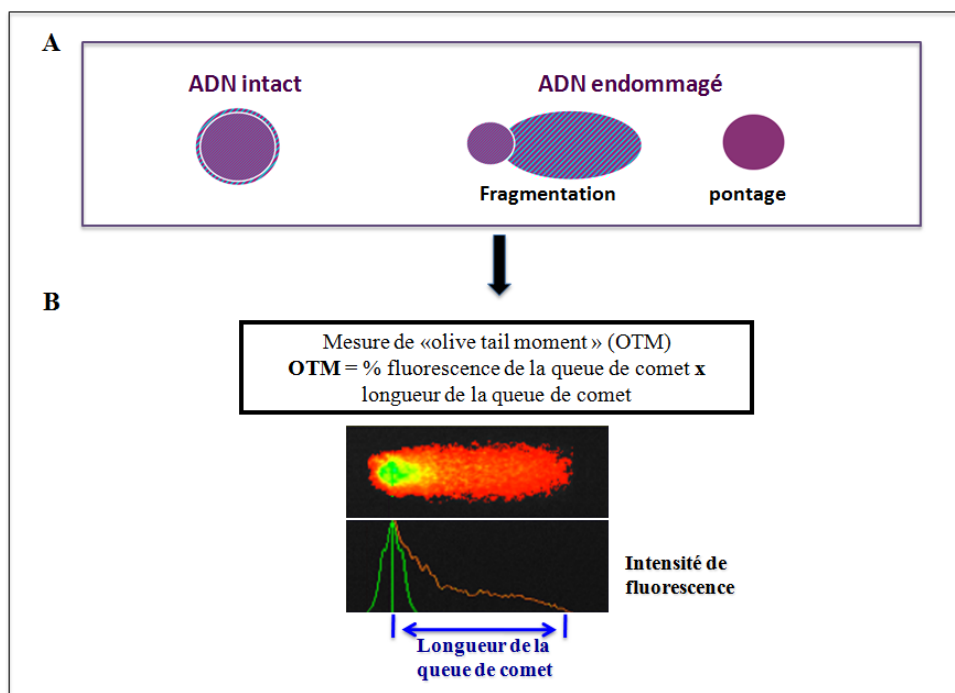


Figure 16: Technique de Comet assay. A. représentation schématique de l'ADN intact ou endommagé avec la présence d'une fragmentation ou de pontages. Si l'ADN est fragmenté, on observe la présence de fragments qui migrent plus rapidement dans le gel. Au contraire, la présence de pontages se caractérise par un retard de migration de l'ADN. B. Calcul de l'OTM (pour le terme anglais, « Olive tail moment »), utilisé pour mesurer les dommages à l'ADN.

Dans notre modèle, l'étude de l'intégrité de l'ADN en condition de stress hyperthermique a révélé que l'hyperthermie entraîne des dommages à l'ADN, majoritairement de type pontages, uniquement dans les neurones déficients en Tau. Ce type de dommage ne reflète cependant pas la mort des neurones comme l'indique les résultats du Fast Halo assay.

Dans les neurones déficients en Tau, la réexpression de la protéine Tau humaine sauvage ou de la protéine Tau humaine avec une séquence de localisation nucléaire, prévient les dommages de l'ADN. Par conséquent, la présence de Tau dans le noyau des neurones est suffisante pour protéger l'ADN des dommages induits par l'hyperthermie. La protection de l'ADN n'est donc pas due à un effet indirect médié par les protéines Tau cytosoliques. De plus, l'effet neuroprotecteur vis-à-vis de l'ADN pourrait faire intervenir l'interaction de Tau avec le petit sillon de l'ADN.

En résumé, l'hyperthermie et le stress oxydant induisent une déphosphorylation de Tau qui s'accompagne de son passage dans le noyau des neurones. Dans le noyau, Tau

protège l'ADN des dommages induits par un stress hyperthermique. Ces résultats soulèvent la question de l'implication de la phosphorylation de Tau dans la fonction nucléaire de la protéine et nous ont conduit à étudier l'effet de l'hyperphosphorylation de Tau sur sa localisation et sa fonction neuroprotectrice vis à vis de l'ADN.

1. 2. Effet de l'hyperphosphorylation de Tau sur sa localisation subcellulaire et sa fonction neuroprotectrice : implication dans les Tauopathies

1. 2. 1. Objectif

Au cours de notre étude, nous avons montré qu'un stress hyperthermique ou un stress oxydant conduisent à une déphosphorylation de Tau sur de nombreux sites s'accompagnant d'une translocation nucléaire et d'une accumulation de la protéine dans le noyau des neurones. De plus, dans le noyau, Tau est sous forme déphosphorylée. Par conséquent, l'état de phosphorylation de Tau et plus précisément sa déphosphorylation pourrait être impliquée dans la translocation nucléaire de la protéine.

Dans les Tauopathies, les protéines Tau sont anormalement et hyperphosphorylées. On peut donc se demander si la dérégulation de la phosphorylation observée dans ces pathologies modifierait leur localisation subcellulaire en condition de stress, en particulier lors de stress oxydant, mécanisme impliqué précocement dans la maladie d'Alzheimer.

Ici, nous avons précisé l'implication de la phosphorylation de Tau sur sa localisation et sa fonction vis-à-vis de l'ADN. Pour cela, nous avons étudié les effets d'une hyperphosphorylation de Tau induite par un stress hypothermique, sur la localisation cellulaire de Tau et sur l'intégrité de l'ADN des neurones.

1. 2. 2. Résultats

➤ Effet de l'hypothermie sur la phosphorylation et la localisation subcellulaire de Tau

Nous avons étudié l'état de phosphorylation de Tau et étudié sa localisation dans les neurones en condition de stress hypothermique, connu pour induire une hyperphosphorylation de Tau (Planel *et al.*, 2004; Planel *et al.*, 2007). Pour cela, les cellules ont été incubées 1H à

30 °C (CS, pour le terme anglais « cold stress ») puis nous avons étudié l'état de phosphorylation de Tau par immuno-empreinte après fractionnement subcellulaire. Dans nos conditions, l'hypothermie entraîne une hyperphosphorylation de Tau sur la plupart des sites étudiés c'est-à-dire au niveau des Ser 195 à 202 (anticorps Tau1), de la Thr 212 (anticorps P212) ainsi que des Ser 396-404 (anticorps AD2). Seule la phosphorylation des sites Thr 231 et Ser 235 (anticorps AT180) ne semble pas modifiée par un stress hypothermique.

Dans la fraction nucléaire, on n'observe pas de changement de la quantité ou de l'état de phosphorylation de Tau suite à l'hypothermie indiquant d'une part que, dans ces conditions, Tau ne s'accumule pas dans le noyau des neurones et d'autre part que Tau nucléaire n'est pas hyperphosphorylée par la baisse de la température (Figure 17). Ces résultats renforcent l'idée que l'état de phosphorylation de Tau est fortement impliqué dans sa translocation nucléaire.

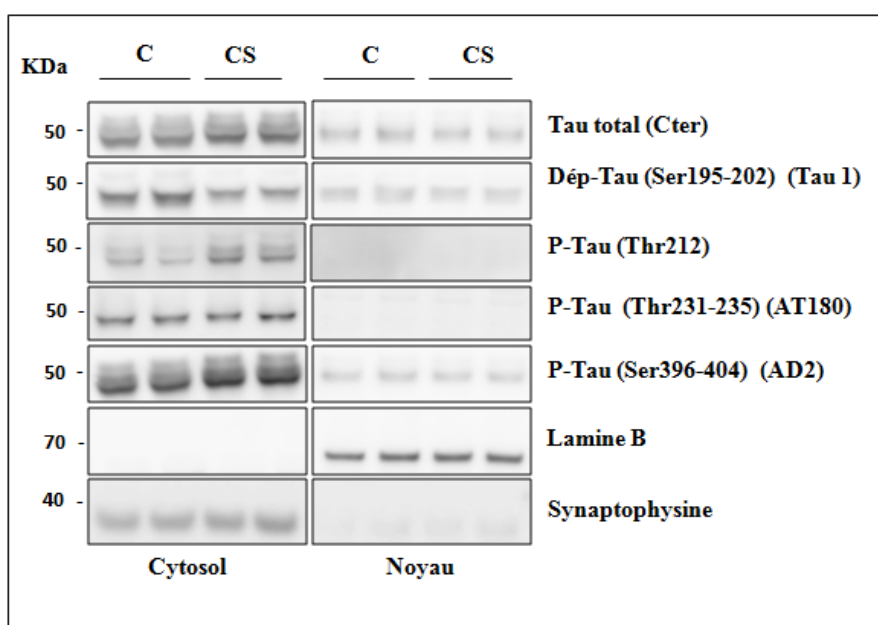


Figure 17: Effet de l'hypothermie sur la phosphorylation et la localisation subcellulaire de Tau. Immuno-empreintes réalisées à l'aide d'anticorps anti Tau phospho-indépendant (anti-Tau Cter) ou phospho-dépendants (Tau1, P-Tau (Thr212), AT180, AD2). L'analyse a été réalisée à partir d'extraits cytosoliques et nucléaires provenant de cultures primaires corticales embryonnaires (10 DIV) incubées ou non 1H à 30°C (CS ou C).

➤ Conséquence d'une hyperphosphorylation de Tau sur l'intégrité de l'ADN en condition d'hypothermie

Dans un premier temps, nous avons vérifié que nos conditions d'hypothermie n'induisaient pas de mort neuronale à l'aide d'un test LDH, c'est à dire en mesurant l'activité

de la lactate déshydrogénase (LDH) libérée des cellules, signe d'une cytotoxicité. L'analyse a révélé que, bien que des lésions au niveau de l'ADN soient induites, ces dommages n'entraînent pas de toxicité cellulaire 24H et 48H après arrêt du traitement (Figure 18).

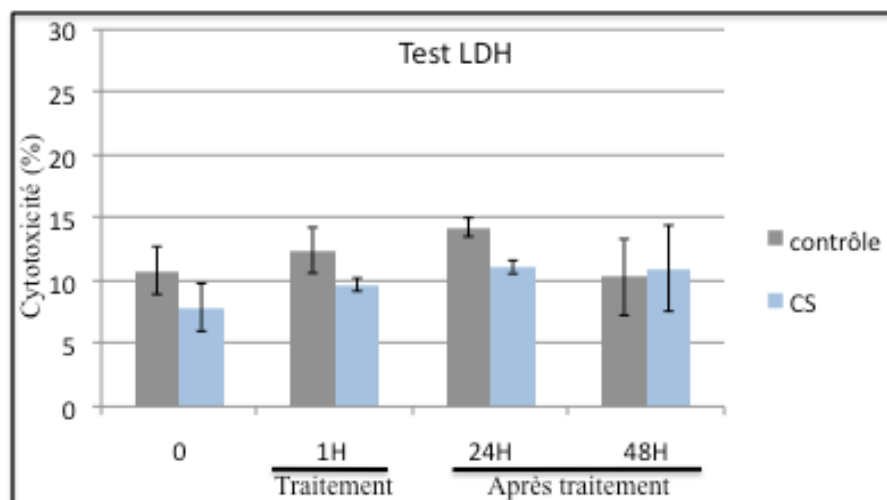
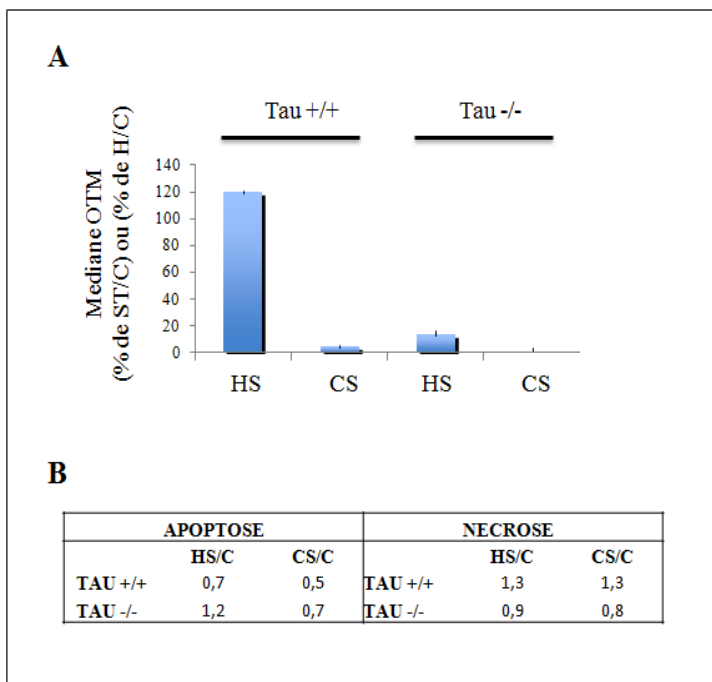


Figure 18: Effet de l'hypothermie sur la viabilité cellulaire. Evaluation de la mort cellulaire par la mesure de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH). Le test LDH a été réalisé dans des cultures primaires de neurones corticaux en condition contrôle (T=0), après 1H à 30 °C (CS), 24H et 48H après arrêt du traitement.

Le rôle de Tau sur l'intégrité de l'ADN en condition de stress thermique a ensuite été analysé par Comet assay en comparant des cultures primaires de neurones corticaux murins sauvages (Tau +/+) ou déficients en Tau (Tau -/-) soumis à une hypothermie (CS) ou une hyperthermie (HS).

Les résultats du Comet assay indiquent que, comme nous l'avons observé précédemment, l'hyperthermie induit des dommages à l'ADN uniquement dans les neurones Tau -/-, majoritairement des pontages reflétés par une baisse de migration de l'ADN par rapport à la condition contrôle. En revanche, en condition d'hypothermie, on observe une forte diminution de la migration de l'ADN et donc une large formation de pontages dans les neurones déficients en Tau mais également dans les neurones sauvages suggérant que, en l'absence d'une augmentation de Tau dans le noyau, l'ADN n'est pas protégé (Figure 19A).

Figure 19: Etude de l'intégrité de l'ADN en condition de stress hyperthermique ou hypothermique dans les neurones sauvages ou déficients en Tau. **A.** L'analyse de l'intégrité de l'ADN a été réalisée par Comet assay dans des neurones sauvages ou déficients en Tau issus de cultures primaires corticales embryonnaires (10 DIV) incubées 1H à 44°C (HS), 1H à 30°C (CS) ou maintenues à 37°C (C). **B.** Analyse de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose par le test du « Fast halo assay » dans les neurones précédemment analysés. Les valeurs représentent le rapport condition contrôle/ condition de stress hyperthermique (HS) ou hypothermique (CS).



Nous avons également vérifié l'absence de mort cellulaire dans nos deux conditions à l'aide de la technique du « *Fast halo assay* » en condition non dénaturante qui permet de détecter et quantifier de façon très sensible les dommages associés à de l'apoptose ou nécrose (Sestili *et al.*, 2006). Cette méthode, basée sur la visualisation de fragments d'ADN après diffusion passive dans un gel, permet de distinguer la fragmentation issue d'un processus apoptotique ou nécrotique (Figure 19B).

Les résultats obtenus confirment ceux obtenus à l'aide du test LDH à savoir que les dommages observés n'entraînent pas de mort cellulaire.

1. 2. 3. Conclusion

L'état de phosphorylation de Tau semble jouer un rôle important dans sa localisation au sein des neurones. En effet, un stress hyperthermique ou un stress oxydant induit une déphosphorylation des protéines et leur translocation dans le compartiment nucléaire. Au contraire, suite à une hypothermie, Tau est hyperphosphorylée et ne s'accumule pas dans le noyau des neurones suggérant que dans ces conditions, la protéine ne pénètre pas dans le compartiment nucléaire ou ressort sans s'y accumuler. Les protéines Tau initialement

localisées dans les noyaux ne sont, de plus, pas phosphorylées par la baisse de température. Ces résultats suggèrent que l'hyperphosphorylation de la protéine cytosolique prévient son accumulation dans le noyau de neurones. Dans ces conditions, L'ADN présente des dommages, majoritairement des pontages mis en évidence par la technique du Comet assay. L'absence d'une quantité suffisante de Tau dans le noyau des cellules pourrait être la cause de cette absence de protection de l'ADN.

L'hyperphosphorylation de Tau est connue pour engendrer des altérations importantes des fonctions de Tau, et est impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies neurodégénératives : les Tauopathies. Cette hyperphosphorylation de Tau pourrait conduire à une perte de la fonction neuroprotectrice des protéines Tau lors de stress en particulier lors d'un stress oxydant, mécanisme qui est précocement impliqué notamment dans la MA.

1. 3. Stress hyperthermique et localisation subcellulaire de protéines partenaires de Tau

1. 3. 1. Objectifs

Comme nous venons de le voir, une augmentation de la température induit le passage de Tau dans le noyau des neurones. Une localisation nucléaire de Tau dans les neurones et d'autres types cellulaires a été mise en évidence à plusieurs reprises. Cependant, aucune étude n'a décrit de passage entre cytosol et noyau. Le poids moléculaire des protéines Tau (supérieur à 40 kDa) indique que les déplacements à travers la membrane nucléaire nécessitent un transport actif des protéines. Cependant, aucune séquence de localisation nucléaire connue n'a été identifiée dans la séquence de Tau. Ce transport pourrait donc impliquer l'intervention de partenaires capables de faire passer Tau à travers la membrane nucléaire.

Plusieurs études ont mis en évidence des interactions entre Tau et diverses protéines. Parmi ces protéines, on retrouve des protéines de choc thermique telles que, HSP 70 ou HSC 70, la protéine Pin 1 ou encore FKPB52 des protéines connues pour interagir avec Tau et être impliquées dans les mécanismes de stress (Chambraud *et al.*, 2010; Dou *et al.*, 2003; Jinwal *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 1999; Sarkar *et al.*, 2008; Shimura *et al.*, 2006).

Pin1 est une prolyl cis/trans isomérase humaine qui catalyse l'isomérisation de la liaison peptidique sur les résidus pSer/pThr précédant les prolines. La protéine se lie à Tau au niveau de sa Thr 231 lorsque le résidu est phosphorylé. Par cette liaison, Pin 1 est capable de modifier la conformation de Tau lui permettant par la suite d'être déphosphorylée par PP2A (Galas *et al.*, 2006; Hamdane *et al.*, 2006; Thorpe *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000).

FKPB52 est une immunophylline qui, dans des cellules PC12 en différenciation, est capable d'inhiber l'accumulation de Tau ainsi que la croissance des neurites. De plus, *in vitro*, la protéine se lie à Tau et en particulier lorsque cette dernière est hyperphosphorylée et inhibe sa capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules (Chambraud *et al.*, 2010). FKBP52 a également une activité peptidyl prolyl cis-trans isomérase, similaire à Pin1 et pourrait donc, comme Pin1 catalyser l'isomérisation de certaines liaisons peptidiques de Tau.

Tau interagit également avec les protéines de choc thermique HSC70 et HSP70. Bien que le rôle de ces associations ne soit pas clairement identifié, certains travaux suggèrent que, en interagissant avec Tau, HSC70 et HSP70 protègent les protéines Tau en condition physiologique et participent à leur dégradation lorsque celles-ci sont altérées (Dou *et al.*, 2003; Jinwal *et al.*, 2010; Shimura *et al.*, 2004a).

Ainsi, nous avons étudié l'effet de l'hyperthermie sur la localisation subcellulaire des protéines HSP 70, HSC 70, la protéine Pin 1 ou encore FKPB52 afin de voir si une corrélation existe entre la localisation de Tau et ces protéines susceptibles de participer à la translocation nucléaire de Tau.

1. 3. 2. Résultats

Dans des cultures primaires de neurones corticaux, nous avons étudié l'effet d'une hyperthermie sur la localisation subcellulaire de plusieurs protéines connues pour interagir avec Tau. Pour cela, les cellules ont été incubées 1H à 44 °C puis la localisation subcellulaire des protéines Pin 1, FKBP57, HSP70 et HSC 70 a été analysée par immuno-empreinte après fractionnement subcellulaire (Figure 20).

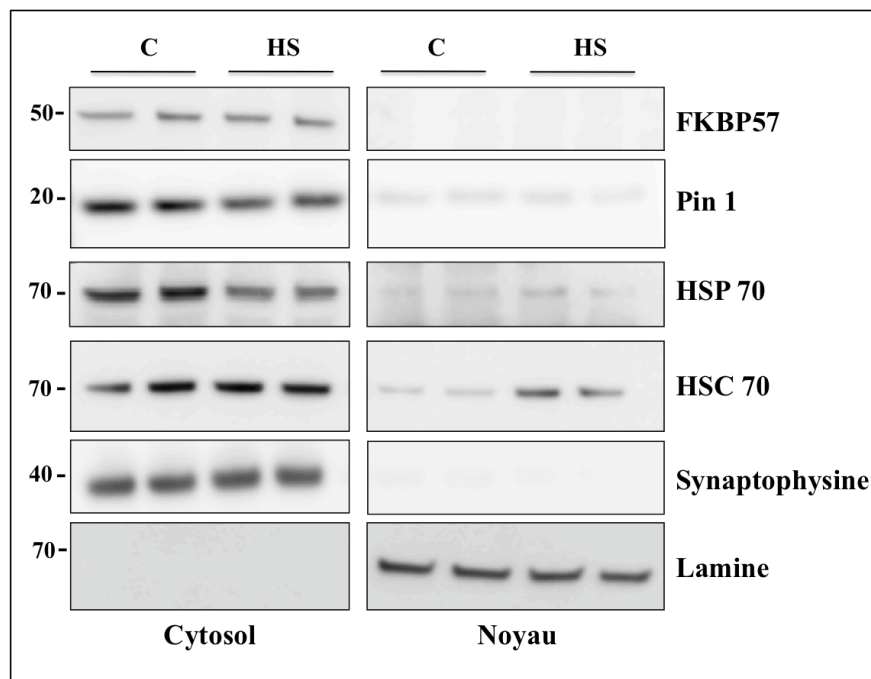


Figure 20: Effet de l'hyperthermie sur la localisation subcellulaire de protéines partenaires de Tau. Immuno-empreintes représentatives de la localisation subcellulaire des protéines FKBP57, Pin 1, HSP 70, HSC 70 dans des cultures primaires corticales embryonnaires (10 DIV) incubées 1H à 44°C (HS) ou maintenues à 37°C (C). La détection des protéines FKBP57, Pin 1, HSP 70, HSC 70 a été réalisée respectivement à l'aide des anticorps anti-FKBP57 (don du Pr Baulieu), anti-Pin1 H123 (Santacruz, sc-15340), anti HSP70 (Santacruz, sc-24) et anti-HSC70 (Santacruz, sc-7298) dans les fractions cytosoliques et nucléaires. La synaptophysine sert de marqueur de la fraction cytosolique et la lamine de marqueur de la fraction nucléaire.

Parmi les protéines étudiées, toutes sont détectées dans la fraction cytosolique. Dans la fraction nucléaire, à l'exception de FKBP57, les protéines sont également présentes en faibles quantités. Après traitement par la chaleur, seule la quantité de HSC70 augmente dans le noyau des neurones suggérant une translocation nucléaire et une accumulation de la protéine en réponse à l'hyperthermie.

1. 3. 3. Conclusion

L'hyperthermie entraîne spécifiquement l'accumulation nucléaire de certaines protéines partenaires de Tau. En effet, parmi les protéines testées, on n'observe pas d'augmentation de la quantité des protéines Pin 1, FKBP52 et HSP70 dans le noyau.

Le poids moléculaire de Pin 1 (environ 18 kDa) suggère un transport passif de la protéine à l'inverse des protéines FKBP52 et HSP70 dont le poids moléculaire (> 40kDa) laisse prédire un mécanisme actif de transport de ces deux protéines.

Par conséquent, le stress hyperthermique ne semble pas n'entraîner pas de perturbation des mécanismes de transport nucléaire ou d'altération de la membrane nucléaire pouvant induire le passage non spécifique de protéines.

De plus, ces résultats indiquent que ces trois protéines ne semblent pas directement impliquées dans le transport de Tau dans le compartiment nucléaire.

La protéine Pin 1 se lie à Tau au niveau du résidu Thr231 lorsque celui-ci est phosphorylé. De même, des études ont montré que FKBP52 se lie davantage à Tau lorsque la protéine est phosphorylée. L'hyperthermie conduisant à une déphosphorylation de Tau sur de nombreux sites dont le site Thr231, il est donc probable que ces deux protéines ne s'associent pas à Tau dans nos conditions. Cependant, ces résultats ne permettent pas de conclure quant à leur participation éventuelle dans la déphosphorylation de Tau.

Au contraire, nous avons mis en évidence une translocation nucléaire de la protéine HSC 70 en réponse au stress hyperthermique. HSC 70 est une protéine de choc thermique exprimée de manière constitutive et localisée dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Elle est connue pour être impliquée dans plusieurs processus notamment la localisation subcellulaire ou la dégradation de protéines et joue un rôle dans la protection des cellules en condition de stress (Imamoto *et al.*, 1992; pour revue, (Richter-Landsberg and Goldbaum, 2003); Shi and Thomas, 1992). Plusieurs travaux ont mis en évidence une translocation nucléaire HSC70 en réponse à un stress hyperthermique (Tsukahara and Maru, 2004; Kodiha *et al.*, 2005), données en accord avec les résultats que nous avons obtenus. Cette corrélation entre la localisation de Tau et HSC70 en condition de stress suggère que cette dernière pourrait être impliquée dans les mécanismes de translocation de Tau dans le noyau de neurones.

L'étude des mécanismes intervenant dans la translocation nucléaire de Tau nous a ensuite amené à nous intéresser aux régions de Tau potentiellement impliquées dans son transport nucléo-cytoplasmique.

2. Isoformes de Tau et translocation nucléaire

2. 1. Objectifs

Dans le système nerveux central, un épissage alternatif a lieu sur le transcrit primaire du gène codant pour Tau. Cet épissage donne naissance à 6 isoformes de Tau qui diffèrent de part la présence ou non des exons 2 et 3 et 10. Les protéines sont constituées de 3 ou 4 domaines répétés au niveau de leur domaine de liaison aux microtubules en fonction de l'inclusion ou non de l'exon 10 dans leurs transcrits qui détermine la présence du 2^{ème} domaine répété sur les protéines. Parmi les 6 isoformes de Tau, 3 isoformes sont constitués de 4 domaines de répétition, on parle de « Tau 4R », les 3 autres comportent 3 domaines répétés et sont dits « Tau 3R ». Les fonctions des isoformes de Tau sont similaires bien que certaines différences soient à noter. Par exemple, les isoformes Tau 4R se lient plus efficacement aux microtubules favorisant davantage leur polymérisation et leur stabilité que les isoformes Tau 3R. De même, des différences d'affinité pour certaines protéines membranaires comme FYN ont été observées entre les isoformes Tau 3R et Tau 4R (Bhaskar *et al.*, 2005). Plusieurs études ont décrit la présence des protéines Tau dans le noyau des neurones et autres cellules de types neuronales. Cependant, la composition en isoformes et les domaines impliqués dans le passage nucléaire des protéines Tau ne sont pas connus.

Nous nous sommes intéressés aux différentes isoformes capables de transloquer dans le noyau de cellules neuronales en condition de stress hyperthermique. Dans ce but, nous avons utilisé des neurones corticaux issus d'embryons de souris. Dans ces neurones embryonnaires, les isoformes 3R et 4R de Tau sont présents à l'inverse des neurones murins adultes principalement constitués des isoformes Tau 4R (McMillan *et al.*, 2008). L'utilisation des neurones embryonnaires de souris nous a ainsi permis de comparer la localisation des isoformes de Tau 3R et 4R en condition de stress hyperthermique et ainsi d'étudier de rôle de la séquence codée par l'exon 10 dans la localisation de Tau. L'implication potentielle des séquences de Tau codées par les exons 2, 3 a également été analysée à l'aide de la lignée de cellules de neuroblastomes SH-SY5Y stablement transfectée avec des isoformes de Tau possédant ou non les séquences codant pour ces exons.

2. 2. Matériel et méthodes

➤ **Entretien des lignées cellulaires SH-SY5Y**

La lignée cellulaire utilisée (SH-SY5Y) dérive de cellules issues de neuroblastomes humains. Elles ont par conséquent la capacité de se diviser. L'entretien et l'amplification des cellules s'effectuent à une température de 37°C et dans un environnement contenant 5% en CO₂. Le milieu de culture utilisé est un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, GIBCO BRL) supplémenté en sérum de veau foetal (10%), en acides aminés non-essentiels (1mM), en L-glutamine (2mM) et en pénicilline/streptomycine (50U/ml). Lorsque les cellules sont à confluence, celles-ci sont rincées au PBS (GIBCO BRL) puis décollées de leur support suite à une incubation avec une solution de Trypsine/EDTA (GIBCO BRL), à 37°C sous 5% en CO₂ pendant quelques minutes. L'inactivation de la trypsine est réalisée par ajout de milieu de culture complet.

➤ **Etablissement des populations cellulaires stablement transfectées**

Le vecteur d'expression plasmidique pNTap

Le vecteur d'expression utilisé pour exprimer différentes isoformes de Tau au sein de la lignée SH-SY5Y est le vecteur plasmidique eucaryote pNTap (InterPlay® N-terminal Mammalian TAP System, STRATAGENE). La particularité de ce vecteur réside dans la présence de la séquence codante de 2 étiquettes polypeptidiques distinctes placées en tandem au niveau 5' de la séquence codante à insérer (en l'occurrence Tau) qui sont : la séquence du « *streptavidin binding peptide* » (SBP) et celle du « *calmodulin binding peptide* » (CBP) (Figure 21).

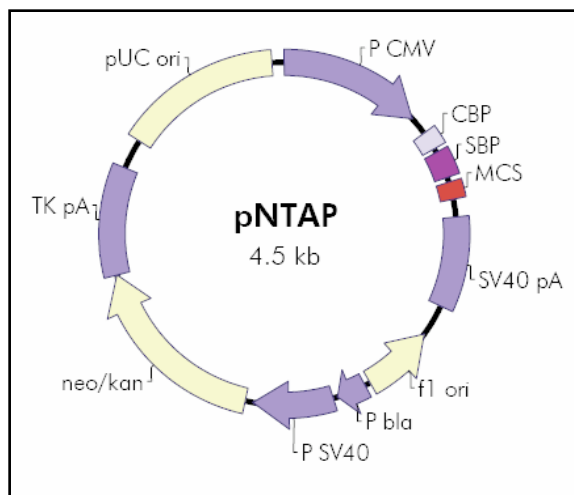


Figure 21 : Représentation schématique du vecteur d'expression plasmidique pNTap

pCMV : promoteur permettant l'expression eucaryote du transgène ; CBP : séquence codante du peptide se liant à la calmoduline ; SBP : séquence codante du peptide se liant à la streptavidine ; MCS : site multiple de clonage où la séquence codante du transgène est insérée, neo/kan : région renfermant la séquence codante pour la résistance à la généticine (G418).

Transfections stables et sélection des populations cellulaires stables

Les transfections ont été réalisées dans la lignée SH-SY5Y à l'aide du kit Exgen 500 (*Euromedex*), composé de polymères d'éthylèneimine linéaires qui en présence d'ADN forment des microprecipités qui pénètrent dans la cellule par endocytose.

Les cellules mises en culture dans une plaque 6 puits (9cm²) sont transfectées par lipofection lorsqu'elles atteignent 50% de confluence (Exgen500, EUROMEDEX). On réalise un mélange plasmides/Exgen500 avec 4µg de plasmides pour 20µL d'exgen dans un volume de 400µL de DMEM. Le mélange est ensuite incubé pendant 15 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes ADN/lipides, puis ajouté aux cellules. Après 3 heures d'incubation à 37°C, 4 ml de milieu de culture complet sont rajoutés aux cellules. Le lendemain, le milieu est remplacé par un milieu DMEM complet dans lequel l'antibiotique nécessaire à la sélection clonale a été rajouté (G418; Gibco BRL ; 400µg/ml).

La sélection clonale est maintenue durant 4 à 5 semaines, par changement de milieu DMEM complet additionné de G418 3 fois par semaine. A l'issue des 5 semaines de sélection, la population clonale résistante est amplifiée par passage en boîte de culture de 25 cm² pour caractérisation et entretien.

2. 3. Résultats

Nous avons tout d'abord analysé la présence des isoformes 3R et 4R de Tau dans des cultures primaires de neurones corticaux dans les fractions cytosoliques et nucléaires par immuno-empreinte.

Les isoformes de Tau 3R et 4R sont toutes deux présentes dans les cultures primaires utilisées. Dans la fraction nucléaire, les 2 types d'isoformes sont également détectés et augmentent en condition d'hyperthermie indiquant que les isoformes de Tau 3R et 4R passent dans le compartiment nucléaire (Figure 22).

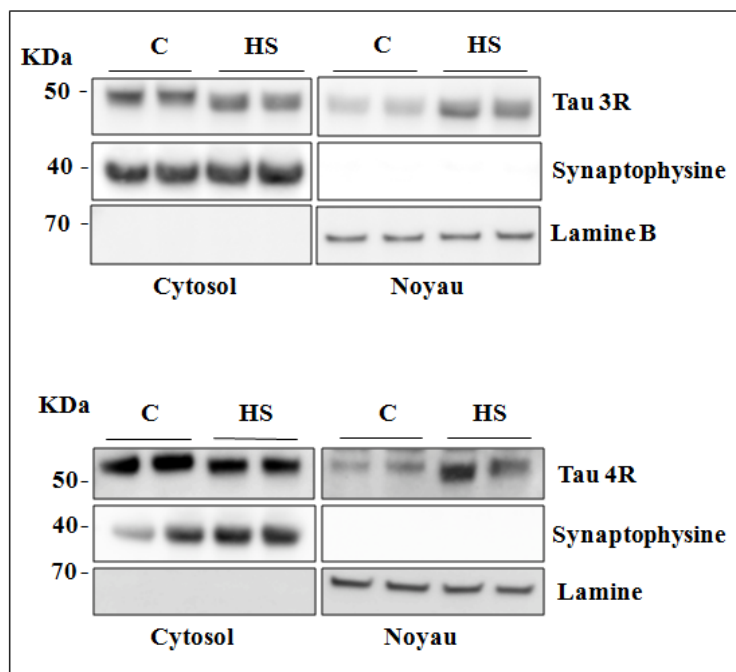


Figure 22: Etude de l'effet d'un stress hyperthermique sur la localisation subcellulaire des isoformes 3R et 4R de Tau dans les neurones. Immuno-empreintes réalisées à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement les isoformes Tau 3R ou Tau 4R à partir d'extraits cytosoliques et nucléaires provenant de cultures primaires corticales embryonnaires (10 DIV) incubées 1H à 44°C (HS) ou maintenues à 37°C (C).

Cependant, une détection correcte des isoformes 4R de Tau, en particulier dans la fraction nucléaire, a nécessité l'utilisation d'une méthode de détection plus sensible que celle couramment utilisée lors de la révélation des membranes d'immuno-empreinte (kit « ECL detection reagent » (Electro Chemo Luminescence, Amersham)). Dans le cas présent, le kit « Super signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate » (Thermo scientific) a été utilisé pour permettre de visualiser le marquage de Tau 4R dans la fraction nucléaire.

De ce fait, à méthode identique, les quantités de Tau 4R semblent beaucoup plus faibles que celles des Tau 3R, en particulier dans la fraction nucléaire bien que ces variations puissent également être en partie dues à des différences de sensibilité entre des anticorps utilisés.

Nous avons ensuite analysé le rôle des séquences codées par les exons 2, 3 et 10 dans la localisation de Tau dans des lignées cellulaires de neuroblastomes SH-SY5Y stablement transfectées avec différentes isoformes de Tau possédant ou non les séquences codées par les exons 2, 3 et 10 (isoformes 2- 3- 10- ; 2+ 3- 10- et 2+ 3+ 10+). Nous avons étudié, comme précédemment, la localisation subcellulaire des différentes isoformes de Tau suite à un stress hyperthermique dans les fractions cytosoliques et nucléaires par immuno-empreinte (Figure 23).

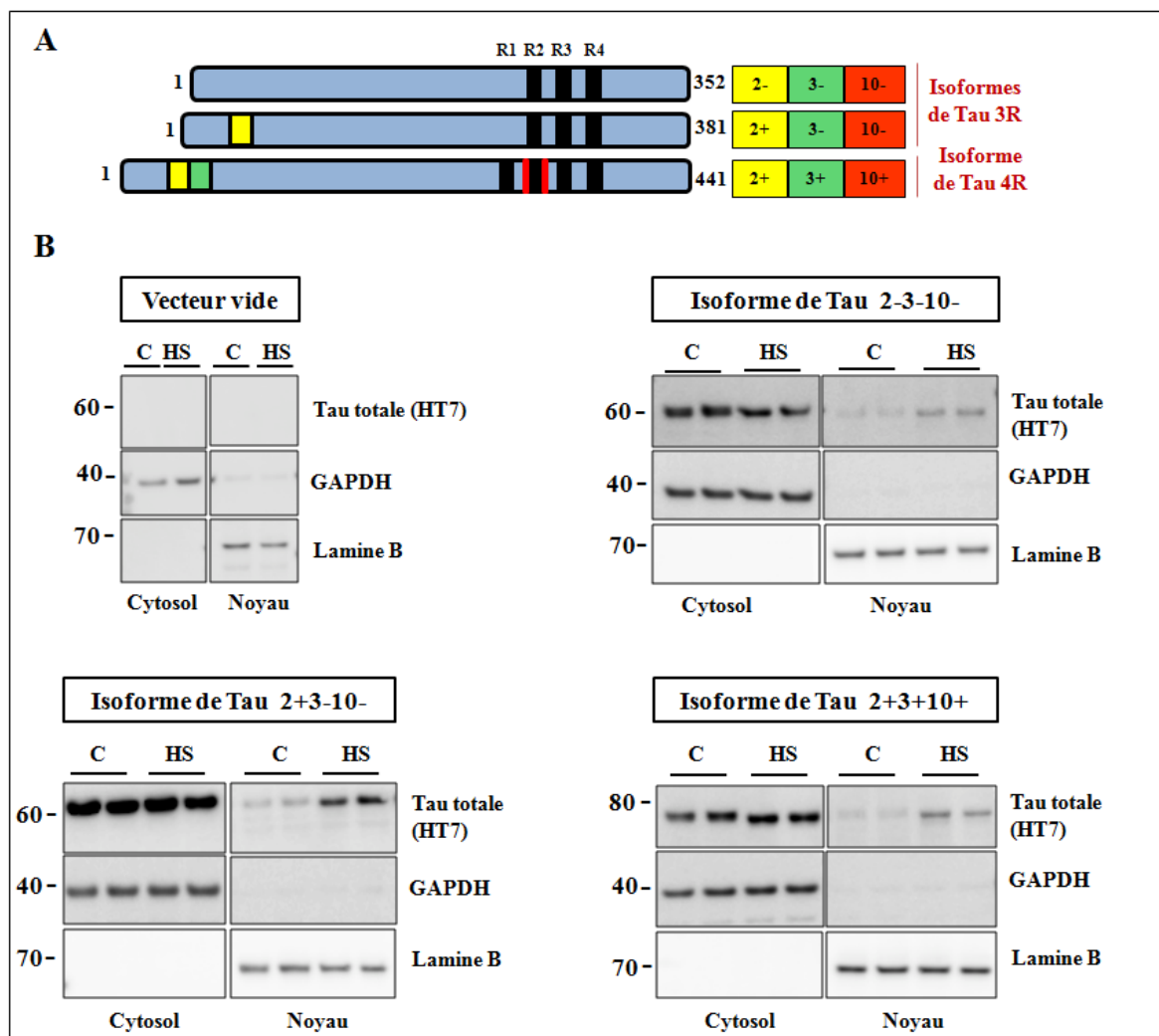


Figure 23: Etude de l'effet d'une hyperthermie sur la localisation subcellulaire des différentes isoformes de Tau. A. Représentation schématique des trois isoformes de Tau utilisées pour l'établissement des lignées stables (isoformes 2- 3- 10- , 2+ 3- 10- et 2+ 3+ 10+). B. Immuno-empreintes révélées à l'aide d'un anticorps anti Tau total (HT7) dirigé contre les différentes isoformes de Tau. L'étude a été réalisée à partir d'extraits cytosoliques et nucléaires provenant de la lignée cellulaire SH-SY5H stablement transfectée et exprimant les isoformes 2- 3- 10- , 2+ 3- 10- , 2+ 3+ 10+ ou n'exprimant pas Tau (vecteur vide). Les cellules ont été incubées 1H à 44°C (HS) ou maintenues à 37°C (C).

Nous avons ainsi observé que les 3 isoformes testées sont présentes à la fois dans le cytosol et le noyau des cellules quoique très majoritairement localisées dans le cytosol. De plus, la quantité de toutes les isoformes testées augmente dans la fraction nucléaire après le traitement des cellules par la chaleur (Figure 23). Par conséquent, les isoformes de Tau 2-3-10-, 2+3-10- et 2+3+10+ transloquent et s'accumulent dans le noyau des cellules en réponse à un stress hyperthermique.

2. 4. Conclusion

L'étude de la présence et de la localisation cellulaire des isoformes 3R et 4R dans les neurones soumis à un stress hyperthermique a révélé que les deux types d'isoformes sont présents dans les neurones corticaux murins et passent dans le compartiment nucléaire. Par conséquent, le 2^{ème} domaine répété codé par l'exon 10 ne semble pas essentiel au transport nucléo-cytoplasmique de Tau.

Dans les cellules de neuroblastomes SH-SY5Y, nous avons également observé une translocation nucléaire en condition de stress thermique de toutes les isoformes testées soit des isoformes de Tau 2-3-10-, 2+3-10- et 2+3+10+. Ces données confirment les résultats obtenus dans les neurones et montrent, de plus, que le transport des protéines dans le noyau semble également indépendant de la présence ou de l'absence des séquences de Tau codées par les exons 2 et 3. Par conséquent, il est probable que les six isoformes de Tau soient capables de passer dans le compartiment nucléaire suite à un stress hyperthermique.

La capacité de passage des différentes isoformes de Tau dans le noyau peut varier. Cependant, dans cette étude, en raison de l'absence de lysats totaux qui auraient permis d'évaluer l'efficacité de transfection de chaque plasmide, nous n'avons pas pu quantifier l'accumulation des protéines Tau dans le compartiment nucléaire. Les résultats permettent donc uniquement de préciser que les séquences codées par les exons 2, 3 et 10 ne sont pas essentielles au passage et à l'accumulation de Tau dans le noyau des neurones en condition de stress hyperthermique.

Une étude complémentaire serait nécessaire pour quantifier l'efficacité de translocation et l'accumulation de chaque isoforme dans le noyau des neurones et préciser le rôle potentiellement modulateur de ces séquences.

Discussion

Discussion

1. Stress et localisation de Tau dans les neurones : implication de la phosphorylation de Tau

1. 1. Mécanismes impliqués dans la translocation et accumulation nucléaire de Tau

Au cours de notre étude, nous avons montré qu'un stress hyperthermique et un stress oxydant entraînaient une translocation et accumulation réversible des protéines Tau dans le noyau des neurones. Des stress comme l'hyperthermie et le stress oxydant sont connus pour induire la translocation nucléaire de nombreuses protéines telles que des protéines chaperonnes mais également des protéines impliquées dans l'étiopathologie de maladies neurodégénératives. En effet, suite à un stress hyperthermique, on observe une augmentation des protéines de chocs thermiques comme HSP 70, le complexe HSP70/HSP90 et HSC 70 (Daniel *et al.*, 2008; Kotoglu *et al.*, 2009; Neri *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998) dans le noyau des cellules. De même, une translocation nucléaire de l'alpha-synucléine a été observée suite à un stress oxydant (Xu *et al.*, 2006) et celle de l'ataxine-3 (Reina *et al.*, 2010) après un stress hyperthermique ou oxydant, des protéines impliquées respectivement dans la maladie de Parkinson et l'ataxie spino-cérébelleuse de type 3.

Les mécanismes d'import et d'export de protéines à travers la membrane nucléaire sont hautement régulés et font intervenir les pores nucléaires situés dans la membrane. Les protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 40 kDa peuvent ainsi passer la membrane nucléaire de manière passive contrairement à des protéines de plus haut poids moléculaire qui requièrent la reconnaissance de signaux spécifiques par des protéines de transport pour traverser des complexes de pores nucléaires. Ces signaux sont des séquences de localisation nucléaire ou NLS (pour le terme anglais « nuclear localization sequence ») situées sur les protéines qui doivent pénétrer dans le compartiment nucléaire. A l'inverse, la présence d'une séquence d'export nucléaire, NES (pour le terme anglais « nuclear export sequence ») permet l'export de protéines en dehors du noyau (pour revue (Terry *et al.*, 2007)). Concernant les protéines Tau, leur poids moléculaire supérieur à 40 kDa (environ 50 kDa chez la souris) suggère un transport actif des protéines. Cependant, les séquences des protéines Tau ne présentent pas de séquences NLS ni de NES classiques suggérant que leur transport nucléaire

nécessite une interaction avec une ou plusieurs protéines possédant une NLS pour leur faire traverser les pores nucléaires.

Les protéines Tau interagissent avec un certain nombre de protéines impliquées dans des mécanismes de stress telles que les peptidyl prolyl cis-trans isomérase Pin et FKBP52 (Chambraud *et al.*, 2010 ; Lu *et al.*, 1999), des protéines de chocs thermiques comme HSP 27 (Shimura *et al.*, 2004b), HSP70, HSP90 (Dou *et al.*, 2003) et HSC 70 (Sarkar *et al.*, 2008; Shimura *et al.*, 2006).

Lors de notre étude, nous avons observé une augmentation de la quantité de HSC 70 dans le noyau des neurones en condition de stress thermique. En revanche, la localisation de Pin1, FKBP52 et HSP70 ne varie pas suggérant que ces protéines ne sont pas directement impliquées dans le transport de Tau.

La protéine HSC 70 intervient dans plusieurs processus notamment la protection des cellules, la dégradation et la localisation subcellulaire de protéines en condition de stress. HSC 70 participe au transport de protéines dans le noyau des cellules. Des études ont, en effet, montré que son inhibition prévenait l'import nucléaire de protéines telles que l'histone H1, la nucléoplasmine et l'antigène SV-40 (Imamoto *et al.*, 1992; Shi and Thomas, 1992).

HSC 70 possède un NLS et un NES lui permettant de changer de compartiment en réponse à divers changements physiologiques (Tsukahara and Maru, 2004). Cette corrélation entre la localisation de Tau et HSC70 en condition de stress suggère que cette dernière pourrait être impliquée dans les mécanismes de translocation de Tau dans le noyau de neurones.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le transport nucléocytoplasmique de Tau, nous avons également tenté de rechercher des partenaires potentiels de Tau dans le compartiment nucléaire par immuno-précipitation de Tau suivi d'une identification par spectrométrie de masse. Cependant, bien que nous ayons réussi à immuno-précipiter Tau dans la fraction nucléaire en condition contrôle ou de stress, nous n'avons pas, jusqu'ici, identifié de partenaires.

L'accumulation nucléaire de Tau pourrait être la conséquence d'une altération des mécanismes d'import ou export suite à un stress hyperthermique ou oxydant.

En condition d'hyperthermie, le transport nucléocytoplasmique de certaines protéines est perturbé. Par exemple, le stress abolit l'export nucléaire de HSC 70 entraînant son accumulation dans le noyau des cellules. Ce mécanisme est cependant transitoire puisque son transport dans le cytosol est rétabli après le retour à une température normale (Kodiha *et al.*, 2005). Les stress hyperthermiques ou oxydants sont connus pour induire une accumulation et rétention de l'importine- α dans le noyau, une protéine reconnaissant les séquences NLS et

donc impliquée dans le transport nucléaire des protéines (Kodiha *et al.*, 2008; Miyamoto *et al.*, 2004). D'autres travaux ont récemment montré une inhibition des mécanismes d'export nucléaire de protéines médiée par Crml, une protéine membre de la famille des importines- β impliquée dans la reconnaissance des NES, en réponse à un stress oxydant (Crampton *et al.*, 2009). De ce fait, les stress thermiques et oxydants pourraient induire le blocage des systèmes d'export et la rétention de protéines impliquées dans le transport protéique de Tau conduisant à l'accumulation des protéines dans le noyau.

1. 2. Implication de la phosphorylation de Tau dans sa localisation dans les neurones.

La translocation nucléaire de Tau induite par l'hyperthermie est corrélée avec une déphosphorylation de la protéine.

Dans le noyau, les protéines Tau sont majoritairement sous forme déphosphorylée bien que la protéine reste phosphorylée sur les sites Ser 262 et Ser 356. La déphosphorylation de ces sites ne semble donc pas essentielle au transport de Tau dans le noyau.

Peu de choses sont connues concernant l'état de phosphorylation de Tau dans le noyau des cellules. La plupart des études utilisent l'anticorps Tau1 afin de visualiser Tau dans le noyau. Or, Tau1 reconnaît les sites Ser195/198/199/202 lorsque ces derniers sont déphosphorylés. Certains anticorps anti-pTau tels que PHF-1 (Ser396/404) et AT8 (Ser199/202 et Thr205) ont également été testés mais n'ont pas permis de détecter Tau suggérant que Tau nucléaire est déphosphorylée sur ces résidus (Arrasate *et al.*, 2000). Dans des cellules de neuroblastomes humains, une baisse du marquage nucléaire de Tau est d'ailleurs observée après traitement des cellules par de l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatase (Lefebvre *et al.*, 2003).

De plus, suite à un stress hypothermique, les protéines sont hyperphosphorylées et ne s'accumulent pas dans le noyau des neurones. Dans la fraction nucléaire, Tau n'est pas hyperphosphorylée suggérant que les protéines hyperphosphorylées ne pénètrent pas ou ne s'accumulent pas dans le noyau. Par conséquent, l'état de phosphorylation des protéines Tau semble jouer un rôle important dans les mécanismes de transport de Tau à travers la membrane nucléaire. Cependant, on ne peut exclure la possibilité que l'absence de translocation nucléaire de Tau soit due à une altération des mécanismes de transport spécifiques de Tau induite par ce type de stress indépendamment de son état de phosphorylation. Néanmoins, ce type d'hypothermie n'est pas connu pour bloquer les

systèmes de transport nucléo-cytoplasmique des protéines dans les cellules puisque des protéines comme la 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase sont connues pour s'accumuler dans le noyau de cellules en réponse à une baisse de température (Hoshino and Fujii, 2007).

L'induction d'une hyperphosphorylation de Tau par une autre méthode telle que le traitement par le peptide A β (connu pour induire une hyperphosphorylation de Tau dans les cellules) (Lopes *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2009) ou par l'inhibition de phosphatases en condition de stress hyperthermique nous permettrait de confirmer l'implication de la phosphorylation dans sa localisation subcellulaire.

D'autres études sont nécessaires afin de préciser le rôle de la phosphorylation de Tau dans sa localisation subcellulaire et plus précisément les sites impliqués dans la régulation du transport de la protéine. Dans ce but, l'expression de protéines Tau mutées sur certains résidus afin de mimer un état phosphorylé ou déphosphorylé nous permettrait d'analyser l'implication de la phosphorylation de certains sites spécifiques dans la translocation de Tau dans le compartiment nucléaire.

D'autre part, des travaux réalisés en 2003 ont mis en évidence une relation entre phosphorylation, glycosylation et localisation subcellulaire de Tau. En effet, lorsque la protéine est fortement phosphorylée, le taux d'incorporation de résidus O-GlcNAc diminue. Cette hausse de la phosphorylation associée à la baisse de O-glycosylation est corrélée avec une modification de la localisation cellulaire de Tau et plus précisément à une baisse de la quantité de Tau dans le noyau des cellules (Lefebvre *et al.*, 2003b) ce qui coïncide avec nos résultats. La O-glycosylation étant une modification connue pour moduler la localisation cellulaire de certaines protéines (pour revue (Guinez *et al.*, 2005)), il serait également intéressant d'étudier l'effet de la O-glycosylation sur la translocation nucléaire de Tau dans notre modèle.

2. Liaison Tau-ADN : quel(s) rôle(s) dans les neurones ?

Au cours de l'étude nous avons mis en évidence une interaction entre Tau et l'ADN neuronal.

L'interaction Tau-ADN pourrait faire intervenir certaines régions spécifiques de l'ADN, notamment des régions A/T riches situées dans le petit sillon de l'ADN puisque que l'ajout de la nétoprosine, un ligand spécifique du petit sillon de l'ADN ayant une forte affinité pour certaines séquences A/T riches, modifie la localisation de Tau dans les neurones et plus précisément entraîne une diminution de la quantité de Tau dans le noyau.

Plusieurs études ont montré la formation de complexes Tau-ADN *in vitro* ou *in situ* (Corces *et al.*, 1980; Hua and He, 2003; Qu *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2008). Parmi les séquences d'ADN analysées, Tau interagit aussi bien avec les séquences alpha satellites A/T riches d'origine humaine qu'avec des séquences synthétiques poly dI/dC, séquences qui partagent de fortes similarités structurales avec les bases A/T de l'ADN (Sjöberg *et al.*, 2006). Ceci est en accord avec une récente étude mettant en évidence la capacité de Tau à interagir avec l'ADN double brin à travers des séquences A-T riches du petit sillon. Dans cette étude, la liaison de Tau au niveau de ces séquences A/T riches protège l'ADN des attaques par les radicaux libres et de la digestion par les DNAses (Wei *et al.*, 2008).

Nos résultats concordent avec ces données et suggèrent que dans les neurones, Tau pourrait protéger l'ADN à travers son interaction avec certaines séquences A/T riches du petit sillon de l'ADN.

La liaison au petit sillon de l'ADN semble être un mécanisme de protection commun à divers types cellulaires pour protéger de manière efficace leur génome. Par exemple, l'histone H1 et Hmbg1 sont des protéines architecturales de la chromatine qui se lient au petit sillon de l'ADN et confèrent par ce moyen une protection de l'ADN contre des dommages provoqués par les radiations (Giavara *et al.*, 2005; McCauley *et al.*, 2007; Roque *et al.*, 2004). Chez les procaryotes, les spores de la bactérie *Bacillus* représentent un modèle étonnant de protection de l'ADN par l'intermédiaire de la liaison de protéine au petit sillon de l'ADN. En effet, les spores dormantes de cette bactérie peuvent survivre de nombreuses années et résister aux attaques extérieures comme les ultraviolets, la chaleur, le dessèchement, des agents chimiques, des enzymes et radiations. En plus de la contribution de nombreux facteurs, la résistance des spores est largement due à la protection de son ADN par l'intervention de petites protéines appelées SASP (pour le terme anglais « small acid-soluble protein »). Il est établi que ces protéines, en se liant au petit sillon de l'ADN, le protègent efficacement en

modifiant la structure de l'ADN (Frenkiel-Krispin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008; Seltow, 2007). Ainsi, la protection de l'ADN à travers la liaison de protéines sur des régions A/T riches localisées dans le petit sillon de l'ADN pourrait être un mécanisme ancestral de protection cellulaire conservé au cours de l'évolution faisant intervenir un certain nombre de protéines dont Tau pourrait faire partie.

Par ailleurs, le passage et l'accumulation de Tau sont réversibles ce qui permettrait d'éviter de bloquer et altérer les mécanismes de transcription essentiels à la physiologie du neurone.

Les neurones sont des cellules qui ne se divisent pas et sont très vulnérables aux diverses attaques, en particulier par les ROS générées lors du stress oxydant (pour revue (Barzilai *et al.*, 2008)). Elles doivent élaborer des mécanismes de défense efficaces pour assurer leur longévité.

De ce fait, le complexe Tau-ADN pourrait être essentiel à la protection de l'ADN neuronal dont l'intégrité est indispensable au bon fonctionnement du neurone. Cette protection pourrait passer par un changement de conformation rendant les molécules d'ADN plus résistantes aux attaques. En effet, certains travaux mettent en évidence des modifications de la conformation de l'ADN et de sa stabilité suite à son interaction avec Tau (Hua and He., 2003; Padmaraju *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2004).

Cependant, le test de compétition que nous avons réalisé entre Tau et la nétrropsine, a révélé qu'une partie des protéines Tau nucléaires ne sont pas déplacées par la nétrropsine malgré une augmentation de la concentration en nétrropsine suggérant que Tau ne se lie pas uniquement sur des séquences A/T riches du petit sillon.

L'analyse de la localisation de Tau dans les neurones en condition de stress hyperthermique par microscopie électronique a révélé la présence de Tau au niveau de plusieurs régions dont le nucléole. Ces observations sont en accord avec des précédentes études décrivant une localisation de la protéine dans des régions d'organisation nucléolaire (NOR) des chromosomes acrocentriques dans des cellules de neuroblastomes en mitose ou dans des régions fibrillaires denses du nucléole lorsque les cellules sont en interphase (Loomis *et al.*, 1990; Thurston *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été observé, *in situ*, que Tau est présente dans la périphérie interne du nucléole, colocalisant partiellement avec une protéine située dans des régions fibrillaires denses du nucléole, la nucléoline. Dans cette étude, une interaction de Tau avec des séquences α -satellites (d'origine humaine) et γ -satellites (d'origine murine) A/T riches organisées comme de l'hétérochromatine constitutive a également été décrite. Ces données laissent suspecter un rôle dans la conformation des

structures nucléolaires et /ou dans l'hétérochromatisation des gènes codant pour les ARN (Sjöberg *et al.*, 2006) impliquée dans les phénomènes d'inactivation de la transcription des gènes.

Il n'est donc pas exclu que la protection de l'ADN médiée par Tau ne soit pas uniquement la conséquence d'une plus grande stabilité de l'ADN suite à sa liaison sur des séquences A/T riches. En effet, en réponse à un stress, les protéines Tau nucléaires pourraient également moduler la transcription de certains gènes impliqués dans la protection de l'ADN soit directement par sa liaison à l'ADN soit plus indirectement à travers une interaction entre Tau et certaines protéines qui, en se liant à l'ADN, module la transcription de gènes notamment des facteurs de transcription ou des enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques de l'ADN (acétyltransférases, déacétylases, méthyltransférases etc...).

Par exemple, une interaction entre Tau et une histone déacétylase (HDAC6), une enzyme cytosolique dont la fonction est de déacétyler des protéines comme la tubuline ou HSP90, a été mise en évidence. HDAC6 est principalement connue pour son implication dans la réponse à certains stress. Elle intervient notamment dans les processus de dégradation des protéines endommagées et favorise l'activation de protéines de choc thermique (Pour revue (Matthias *et al.*, 2008) La liaison Tau-HDAC6 conduit à l'inhibition de HDAC6 et par voie de conséquence à l'augmentation de l'acétylation de ses protéines cibles (Perez *et al.*, 2009). De façon similaire, Tau nucléaire pourrait se lier à des histones déacétylases ou à des acétyltransférases modifiant leur activité et donc l'acétylation des histones. L'acétylation/déacétylation des histones altère la structure de l'ADN affectant l'accès des facteurs de transcription. Il en résulte une modification de l'expression des gènes régulés par ces facteurs. Généralement, une augmentation d'acétylation des histones est associée avec une activation transcriptionnelle. Au contraire, la déacétylation des histones conduit le plus souvent à une répression de la transcription.

Récemment, une étude de transcriptomique, à l'aide de puces à ARN, a été réalisée à partir de tissus provenant d'hippocampes de souris WT ou déficientes en Tau afin d'évaluer des modifications possibles de l'expression génique suite à la suppression de Tau. Les données obtenues ont permis d'identifier une augmentation d'expression du gène *smarcel1* codant pour la protéine BAF-57 (BRG1-associated factor 57) en l'absence de Tau. La protéine BAF-57 fait parti du complexe de remodelage de la chromatine ATP dépendant SWI/SNF impliqué dans la régulation transcriptionnelle (Gomez de Barreda *et al.*, 2010).

De ce fait, de manière plus ou moins directe, Tau pourrait réguler l'expression de certains gènes en modulant l'activité de protéines impliquées dans les modifications de structure de l'ADN.

3. Effet de l'hyperphosphorylation de Tau sur le maintien de l'intégrité de l'ADN : implication dans les Tauopathies.

En réponse à une hypothermie, nous avons observé une hyperphosphorylation de Tau sur de nombreux sites et une absence de passage ou accumulation de la protéine dans le compartiment nucléaire. Par ailleurs, dans ces conditions, on note la présence de lésions au niveau de l'ADN et notamment des pontages (ADN-ADN ou ADN-protéines). L'absence d'une quantité suffisante de Tau dans le noyau des cellules pourrait être à l'origine de cette absence de protection de l'ADN.

Plusieurs études ont décrit un rôle neuroprotecteur de l'hypothermie en particulier en condition d'hypoxie rencontrée par exemple lors d'une ischémie cérébrale. Dans ces conditions, une hypothermie modérée diminue l'apoptose des cellules en les protégeant des dommages induits par le manque d'apport d'oxygène (Hua *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009 ; Li and Wang, 2010).

En 2003, dans un modèle d'hibernation, il a été mis en évidence qu'une augmentation de la phosphorylation de Tau dans l'hippocampe et le cortex d'écureuils était corrélée à une diminution du nombre de synapses. L'hyperphosphorylation de Tau n'entraîne néanmoins pas la formation d'agrégats. De plus, ces effets sont reversés lorsque les animaux sortent de leur état d'hibernation suggérant un mécanisme physiologique de neuroprotection dans ces conditions (Arendt *et al.*, 2003).

Nos résultats peuvent paraître contradictoires avec ces données. Cependant, dans ces études, la présence de dommages spécifiques de l'ADN comme des pontages n'a pas été analysée. De plus, dans nos conditions, nous n'avons pas observé de mort cellulaire par apoptose.

Ainsi, il est probable que l'hypothermie ait des effets plutôt neuroprotecteurs vis-à-vis de la mort cellulaire.

Par ailleurs, certaines études suggèrent que les hypothermies induites par certaines anesthésies générales répétées pourraient accélérer l'apparition ou la propagation de la pathologie Tau (Planel *et al.*, 2009).

Comme nous l'avons suggéré précédemment, l'hyperphosphorylation de Tau pourrait perturber voir empêcher le transport nucléaire de Tau. Il est également possible que Tau hyperphosphorylée ne puisse pas s'associer à l'ADN. Les protéines ressortiraient alors du compartiment nucléaire.

Nous avons étudié, à l'aide du logiciel BindN, la probabilité de liaison de chaque acide aminé de Tau (sur l'isoforme de Tau de 441AA) avec l'ADN ainsi que l'impact de la mutation de certains résidus sur leur probabilité d'interaction avec l'ADN (voir annexe). L'analyse à permis de mettre en évidence certaines régions de Tau, en particulier au niveau de son domaine riche et proline mais également dans sa partie C-terminale, ayant une très forte probabilité de liaison avec l'ADN. Dans ces régions, le remplacement de certaines serines et thréonines par, respectivement, un aspartate ou un glutamate (mimant une phosphorylation des sites) diminue dramatiquement leur capacité de liaison avec l'ADN. Parmi les sites mutés, on distingue les Ser 199 et 205, reconnus par l'anticorps Tau1, la Ser212 (anticorps pTau-212), les sites Thr 231 et Ser 235 (anticorps AT 180), ainsi que les Ser396/404 (anticorps AD2). Les anticorps pTau-212, AT180 et AD2 reconnaissent des sites phosphorylés au contraire de Tau qui ne reconnaît que des sites déphosphorylés. Or dans notre modèle, que se soit dans des neurones embryonnaires ou adultes, à l'exception de l'anticorps 12^E8, seul Tau1 permet de détecter Tau dans la fraction nucléaire suggérant une forte implication de la déphosphorylation de ces sites dans la localisation nucléaire de Tau et dans son interaction avec l'ADN (Figure 24).

Des études réalisées *in vitro* ont montré que Tau partiellement phosphorylée ou hyperphosphorylée est également capable de se lier à l'ADN (Hua and He, 2002; Padmaraju *et al.*, 2010). Néanmoins, les sites phosphorylés ne sont pas identifiés, il est donc possible que, en fonction des résidus phosphorylés, l'impact sur l'interaction de Tau à l'ADN varie.

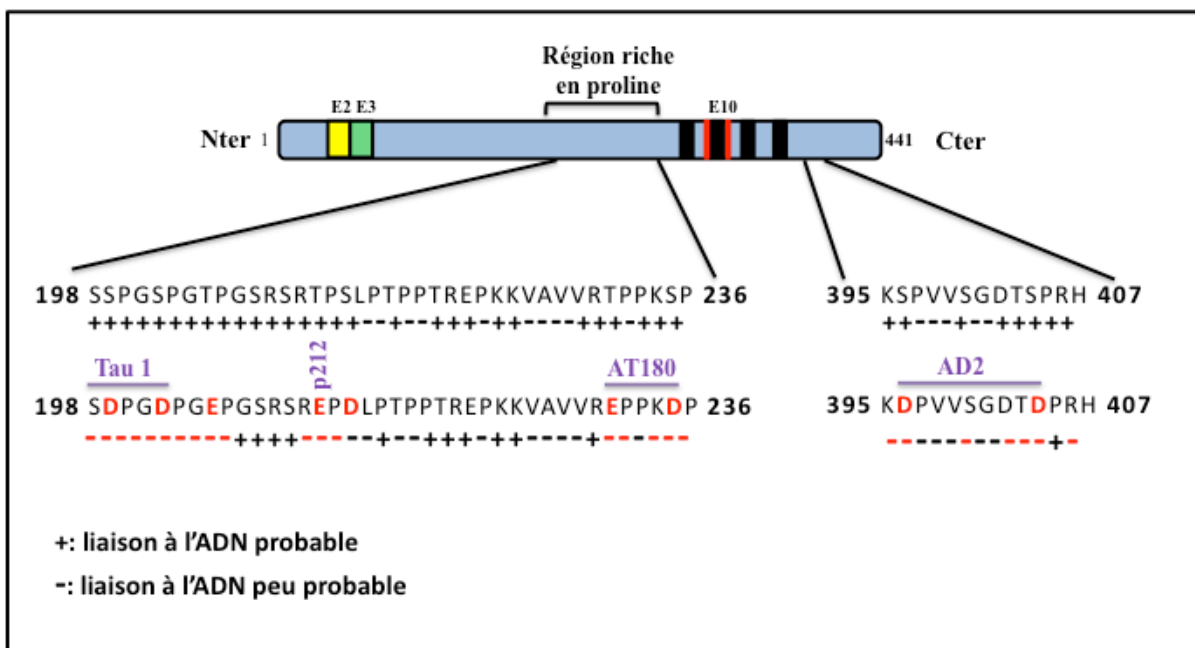


Figure 24: Analyse de la probabilité de liaison entre l'isoforme de Tau la plus longue (441AA) et l'ADN.

La probabilité de liaison de Tau à l'ADN a été analysée à l'aide du logiciel BindN. Le signe « + » correspond à une forte probabilité de liaison des sites au contraire du signe « - » qui indique une faible probabilité de liaison des résidus à l'ADN. L'effet de mutations sur certains résidus a été analysé en remplaçant certains AA par un glutamate (E) ou aspartate (D) mimant une phosphorylation des sites (représentés en rouge). Les résidus dont la probabilité de liaison à l'ADN est modifiée par les mutations de Tau sont représentés en rouge. Les anticorps reconnaissant différentes régions de Tau sont visualisés en violet.

Les stress hyperthermiques et oxydants partagent certaines caractéristiques dont la production de ROS capables d'endommager l'ADN (Bruskov *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006). Au cours de notre étude, nous avons observé que le traitement de cultures primaires de neurones corticaux par le peroxyde d'hydrogène conduit, comme le stress hyperthermique, à la déphosphorylation et translocation nucléaire de Tau. Ces résultats suggèrent que Tau nucléaire pourrait avoir un rôle similaire en condition de stress thermique et oxydant en protégeant l'ADN de l'attaque par les radicaux libres.

Le stress oxydant entraîne la formation de nombreux dommages au niveau des protéines, des lipides et surtout de l'ADN (pour revue (Rao,1993)). Les effets du stress oxydant sur l'intégrité de l'ADN génomique dans les neurones apparaissent fortement impliqués dans les mécanismes liés à la neurodégénérescence. Il a par exemple été observé que, dans des cultures de neurones humains, les promoteurs de gènes liés au transport vésiculaire et aux fonctions synaptiques et mitochondriales sont plus vulnérables et sujets à l'accumulation de dommages causés par le stress oxydant, aboutissant à une baisse de l'expression de gènes impliqués dans

la mémoire, l'intégrité synaptique et la survie neuronale de manière plus générale (Lu *et al.*, 2004).

Par ailleurs, il existe une corrélation entre les neurones présentant de nombreux agrégats de Tau et ceux accumulant des lésions de l'ADN avec l'âge (Schmitz *et al.*, 1999). Une hypothèse intéressante est que les altérations pathologiques des protéines Tau, en particulier l'hyperphosphorylation des protéines, pourraient perturber leur capacité à pénétrer dans le compartiment nucléaire et/ou affecter leur affinité pour l'ADN le rendant plus sensible au stress.

L'hyperphosphorylation de Tau est connue pour engendrer des altérations importantes des fonctions de Tau, et est impliquée dans la physiopathologie de nombreuses maladies neurodégénératives : les Tauopathies.

Ainsi, ces formes pathologiques de Tau (hyperphosphorylées et/ ou agrégées) ne pourraient plus protéger efficacement l'ADN des dommages notamment causés par le stress oxydant, observés dans plusieurs Tauopathies comme la MA, la maladie de Pick ou la PSP (Albers *et al.*, 1999; Castellani *et al.*, 1995; Hatzler *et al.*, 2002; Komori *et al.*, 1998; Odetti *et al.*, 2000). L'inefficacité à protéger l'ADN pourrait ainsi contribuer à perturber le bon fonctionnement des neurones et participer à la physiopathologie de ces pathologies.

En accord avec cette hypothèse, des aberrations chromosomiques (translocation, décondensation, aneuploïdies, coupures de l'ADN...) ont été observées dans les lymphocytes et fibroblastes de patients portant la mutation P301L sur la protéine Tau, mutation associée à des démences fronto-temporales (Rossi *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces résultats renforce l'idée que Tau exercerait un rôle stabilisateur et protecteur vis-à-vis de l'ADN et que son altération pourrait entraîner une perte de sa fonction neuroprotectrice (Figure 25).

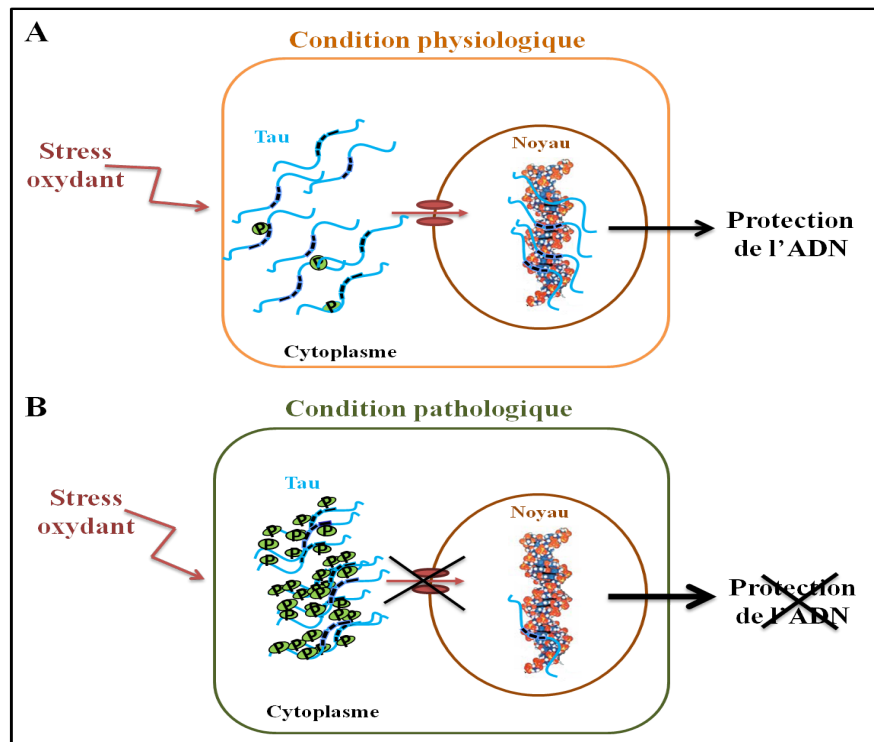


Figure 25: Model possible de protection de l'ADN neuronal par Tau en réponse à un stress oxydant. **A.** En condition physiologique, le stress oxydant entraîne la déphosphorylation et l'accumulation nucléaire de Tau. Dans le noyau, Tau se lie à l'ADN et le protège de l'attaque par les radicaux libres. **B.** En condition pathologique, Tau est hyperphosphorylée et ne s'accumule pas dans le noyau des neurones. Dans ces conditions, Tau ne protège plus l'ADN.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitements efficaces capables de prévenir ou stopper l'évolution de ces pathologies. La plupart des recherches effectuées dans ce domaine visent à contrecarrer les perturbations engendrées par l'altération des protéines Tau cytosoliques. Au vu de nos résultats, l'impact possible de l'altération de Tau nucléaire dans la physiopathologie des Tauopathies n'est pas à négliger. Nous avons montré que la protection de l'ADN pourrait passer, au moins en partie, par sa liaison au petit sillon de l'ADN. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'ajout de ligands réversibles du petit sillon de l'ADN sur les dommages observés en l'absence de Tau. Cependant, ces molécules bloquent la transcription de nombreux gènes, ce qui à long terme pourrait s'avérer délétère pour les cellules si l'effet n'est par reversé. L'utilisation de telles molécules est d'ailleurs testée en thérapeutique anti-cancéreuse (Bielawski and Bielawska, 2008; Marchini *et al.*, 2001). Par conséquent, il est indispensable d'élucider précisément les mécanismes d'action de Tau nucléaire vis à vis de la protection de l'ADN pour pouvoir élaborer des approches thérapeutiques efficaces.

4. Rôle central de la phosphorylation dans les différentes localisations et fonctions de Tau

Dans les neurones, les protéines Tau sont peu phosphorylées. La phosphorylation de Tau sur certains sites comme la Ser262 ou la Thr231 joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'interaction de Tau aux microtubules. En effet, la phosphorylation de ces sites diminue fortement la capacité de liaison de Tau aux microtubules *in situ* (Biernat *et al.*, 1993; Cho and Johnson, 2003). La présence de Tau à la membrane plasmique dépend également de son état de phosphorylation. La phosphorylation de certains de ces sites comme la Thr231 entraîne son détachement des protéines membranaires (Maas *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2008). De plus, Tau associée aux protéines membranaires n'est pas détectée avec les anticorps AT8 (pSer202/pThr202), AT180 (pThr231/pSer235) et PHF-1 (pSer396/404) suggérant que ces sites sont déphosphorylés lorsque Tau se situe au niveau de la membrane plasmique (Arrasate *et al.*, 2000; Maas *et al.*, 2000). Il en est de même dans le noyau où Tau est déphosphorylée sur tous les sites analysés à l'exception des sites Ser262/356 (anticorps 12^{E8}) (Tableau 1).

Localisations de Tau Sites étudiés	Tau associée aux microtubules	Tau associée aux protéines membranaires	Tau nucléaire	Condition pathologique Ex: MA
Tau1 (DépSer195/198/199/202)	++	++	++	+++
P212 (PThr212)	-	?	-	+++
AT 180 (pThr231/pSer235)	-	-	-	+++
12^{E8} (pSer262/356)	-	?	+	+++
AD2 (pSer396/404)	-	-	-	+++

Tableau 1: Implication de la phosphorylation de certains sites de Tau dans sa localisation subcellulaire. Analyse récapitulative de l'état de phosphorylation des sites étudiés au cours de notre étude dans le cytosol, la membrane plasmique (plus précisément lorsque Tau est associée aux protéines membranaires) et le noyau des neurones ainsi que dans un contexte pathologique. Le symbole « - » indique une absence de détection de Tau par l'anticorps utilisé, « + » signifie que l'anticorps détecte Tau, « ++ » une forte détection de Tau et « ? » indique que l'anticorps n'a pas été testé. Enfin, le symbole «+++» signifie que les sites sont hyperphosphorylés.

En conclusion, parmi les modifications post-traductionnelles, un état de phosphorylation adéquat s'avère essentielle à la bonne localisation subcellulaire des protéines leur permettant d'assurer correctement leurs fonctions que ce soit au niveau des microtubules, de la membrane plasmique ou dans le noyau des neurones. Dans les Tauopathies, de nombreux sites, dont ceux que nous avons étudiés, sont hyperphosphorylés.

L'hyperphosphorylation des protéines Tau cytosoliques est considérée comme étant la principale origine des dysfonctionnements observés dans les Tauopathies et conduisant à un processus de neurodégénérescence. Cependant, comme nous l'avons montré, Tau n'est pas uniquement une protéine associée aux microtubules mais davantage une protéine multifonctionnelle. A ce titre, il est probable que les modifications pathologiques de Tau affectent l'ensemble de ses fonctions. Les dysfonctionnements observés dans les pathologies résulteraient alors davantage d'une altération de l'ensemble des fonctions de Tau.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Ce travail a permis de mettre en évidence une nouvelle fonction de Tau dans le noyau des neurones. Pour cela, nous avons développé et caractérisé un modèle dans lequel Tau, en réponse à un stress hyperthermique, est déphosphorylée et transloque dans le noyau des neurones. Dans le noyau, la protéine se lie à l'ADN et le protège des dommages induits par le stress.

Les mécanismes par lesquels Tau protège l'ADN ne sont pas identifiés. Cependant, nos travaux suggèrent que la protection de l'ADN pourrait, au moins en partie, passer par la liaison de Tau à des séquences riches en A/T situées au niveau du petit sillon de l'ADN, induisant une plus grande stabilité de la double hélice.

De plus, au cours de ce travail, nous avons montré que le stress oxydant, un mécanisme précocement impliqué dans la maladie d'Alzheimer, entraîne également la déphosphorylation et la translocation nucléaire de Tau. Par conséquent, Tau pourrait protéger l'ADN neuronal d'un stress oxydant et de manière plus générale de l'attaque par les radicaux libres.

Par ailleurs, l'état de phosphorylation de Tau semble impliqué dans le transport nucléaire de la protéine et/ou dans sa liaison avec l'ADN. En effet, la déphosphorylation de Tau corrèle avec une accumulation de Tau dans le noyau des neurones. En revanche, lorsque la protéine est hyperphosphorylée suite à un stress hypothermique, Tau ne s'accumule pas dans le compartiment nucléaire. Dans ces conditions, on observe la présence de lésions au niveau de l'ADN.

De ce fait, la dérégulation de la phosphorylation des protéines Tau observée dans les Tauopathies pourrait conduire à une perte de la fonction neuroprotectrice de Tau vis-à-vis de l'ADN et participer à l'étiopathologie de ces maladies.

En perspective, une étude plus approfondie des conséquences fonctionnelles de l'interaction entre Tau et l'ADN à travers l'analyse des séquences interagissant avec Tau et la recherche de gènes dont l'expression serait potentiellement affectée par cette association nous permettra de mieux comprendre la fonction de Tau dans le noyau des neurones.

De plus, il serait intéressant de préciser, à l'aide de mutants de Tau, le rôle de la phosphorylation de différents épitopes de Tau dans le transport nucléo-cytoplasmique de la protéine et dans son interaction avec l'ADN.

En résumé, Tau est bien plus qu'une protéine associée aux microtubules, c'est également une protéine nucléaire clé impliquée dans la réponse précoce à un stress neuronal.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Albers DS, Augood SJ, Martin DM, Standaert DG, Vonsattel JP, Beal MF (1999) Evidence for oxidative stress in the subthalamic nucleus in progressive supranuclear palsy. *J Neurochem* 73:881-884.
- Alonso AC, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5562-5566.
- Alonso AC, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med* 2:783-787.
- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K (1997) Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:298-303.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS (1992) Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31:10626-10633.
- Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23:3585-3593.
- Arai T, Miklossy J, Klegeris A, Guo JP, McGeer PL (2006) Thrombin and prothrombin are expressed by neurons and glial cells and accumulate in neurofibrillary tangles in Alzheimer disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:19-25.
- Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Hartig W (2003) Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* 23:6972-6981.
- Areza-Fegyveres R, Rosemberg S, Castro RM, Porto CS, Bahia VS, Caramelli P, Nitrini R (2007) Dementia pugilistica with clinical features of Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr* 65:830-833.

- Armstrong RA, Cairns NJ, Lantos PL (2000) A quantitative study of the pathological lesions in the neocortex and hippocampus of twelve patients with corticobasal degeneration. *Exp Neurol* 163:348-356.
- Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M, Hart GW (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271:28741-28744.
- Arrasate M, Perez M, Valpuesta JM, Avila J (1997) Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol* 151:1115-1122.
- Arrasate M, Perez M, Avila J (2000) Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* 25:43-50.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
- Ashby J, Tinwell H, Lefevre PA, Browne MA (1995) The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis* 10:85-90.

B

- Bancher C, Leitner H, Jellinger K, Eder H, Setinek U, Fischer P, Wegiel J, Wisniewski HM (1996) On the relationship between measles virus and Alzheimer neurofibrillary tangles in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurobiol Aging* 17:527-533.
- Barbato C, Corbi N, Canu N, Fanciulli M, Serafino A, Ciotti M, Libri V, Bruno T, Amadoro G, De Angelis R, Calissano P, Passananti C (2003) Rb binding protein Che-1 interacts with Tau in cerebellar granule neurons. Modulation during neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 24:1038-1050.
- Barzilai A, Biton S, Shiloh Y (2008) The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA Repair (Amst)* 7:1010-1027.
- Basurto-Islas G, Luna-Munoz J, Guillozet-Bongaarts AL, Binder LI, Mena R, Garcia-Sierra F (2008) Accumulation of aspartic acid421- and glutamic acid391-cleaved tau in neurofibrillary tangles correlates with progression in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:470-483.
- Baudier J, Cole RD (1988) Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 263:5876-5883.

- Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E (1993) Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Lett* 336:417-424.
- Beggs HE, Soriano P, Maness PF (1994) NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol* 127:825-833.
- Bennechib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain. *FEBS Lett* 485:87-93.
- Bennechib M, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2001) Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett* 490:15-22.
- Bergamini CM, Gambetti S, Dondi A, Cervellati C (2004) Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Des* 10:1611-1626.
- Bhaskar K, Yen SH, Lee G (2005) Disease-related Modification in Tau Affect the Interaction between Fyn and Tau. *J Biol Chem* 280:35119-35125.
- Bielawski K, Bielawska A (2008) Small-molecule based delivery systems for alkylating antineoplastic compounds. *ChemMedChem* 3:536-542.
- Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11:153-163.
- Biernat J, Mandelkow EM (1999) The development of cell processes induced by tau protein requires phosphorylation of serine 262 and 356 in the repeat domain and is inhibited by phosphorylation in the proline-rich domains. *Mol Biol Cell* 10:727-740.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Biranowska J, Berdel B, Ludkiewicz B, Dziewiatkowski J, Jagalska-Majewska H, Morys J (2000) Developmental changes of MAP2 immunoreactivity in the hippocampus proper and dentate gyrus of the rat. *Folia Neuropathol* 38:1-6.
- Blennow K, Vanmechelen E (1998) Combination of the different biological markers for increasing specificity of in vivo Alzheimer's testing. *J Neural Transm Suppl* 53:223-235.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259.

- Braak H, Braak E (1997) Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging* 18:351-357.
- Brady RM, Zinkowski RP, Binder LI (1995) Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging* 16:479-486.
- Brandt R, Leger J, Lee G (1995) Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131:1327-1340.
- Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J (1985) Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol* 17:89-96.
- Brion JP, Guilleminot J, Couchie D, Flament-Durand J, Nunez J (1988) Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. *Neuroscience* 25:139-146.
- Brion JP, Octave JN, Couck AM (1994) Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons. *Neuroscience* 63:895-909.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, Aburatani H, Hunter K, Stanton VP, Thirion JP, Hudson T, et al. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 69:385.
- Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM (2009) Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov* 8:783-793.
- Bruskov VI, Malakhova LV, Masalimov ZK, Chernikov AV (2002) Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acids Res* 30:1354-1363.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR (2000) Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33:95-130.
- Buee-Scherrer V, Buee L, Hof PR, Leveugle B, Gilles C, Loerzel AJ, Perl DP, Delacourte A (1995) Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. Immunohistochemical characterization of tau proteins. *Am J Pathol* 146:924-932.
- Buee-Scherrer V, Buee L, Leveugle B, Perl DP, Vermersch P, Hof PR, Delacourte A (1997) Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 42:356-359.
- Buee-Scherrer V, Goedert M (2002) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases in intact cells. *FEBS Lett* 515:151-154.

Butner KA, Kirschner MW (1991) Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115:717-730.

C

Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463.

Caparros-Lefebvre D, Elbaz A (1999) Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. Caribbean Parkinsonism Study Group. *Lancet* 354:281-286.

Cardozo-Pelaez F, Song S, Parthasarathy A, Hazzi C, Naidu K, Sanchez-Ramos J (1999) Oxidative DNA damage in the aging mouse brain. *Mov Disord* 14:972-980.

Castano EM, Ghiso J, Prelli F, Gorevic PD, Migheli A, Frangione B (1986) In vitro formation of amyloid fibrils from two synthetic peptides of different lengths homologous to Alzheimer's disease beta-protein. *Biochem Biophys Res Commun* 141:782-789.

Castellani R, Smith MA, Richey PL, Kalaria R, Gambetti P, Perry G (1995) Evidence for oxidative stress in Pick disease and corticobasal degeneration. *Brain Res* 696:268-271.

Chambraud B, Sardin E, Giustiniani J, Dounane O, Schumacher M, Goedert M, Baulieu EE (2010) A role for FKBP52 in Tau protein function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2658-2663.

Chambraud B, Belabes H, Fontaine-Lenoir V, Fellous A, Baulieu EE (2007) The immunophilin FKBP52 specifically binds to tubulin and prevents microtubule formation. *Faseb J* 21:2787-2797.

Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360:674-677.

Chin SS, Goldman JE (1996) Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:499-508.

Cho JH, Johnson GV (2003) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* 278:187-193.

Cho JH, Johnson GV (2004) Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem* 88:349-358.

- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M (2009) Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 11:909-913.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977a) Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116:227-247.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW (1977b) Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116:207-225.
- Corces VG, Manso R, De La Torre J, Avila J, Nasr A, Wiche G (1980) Effects of DNA on microtubule assembly. *Eur J Biochem* 105:7-16.
- Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261:921-923.
- Correas I, Padilla R, Avila J (1990) The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem J* 269:61-64.
- Correas I, Diaz-Nido J, Avila J (1992) Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem* 267:15721-15728.
- Corsellis JA, Bruton CJ, Freeman-Browne D (1973) The aftermath of boxing. *Psychol Med* 3:270-303.
- Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RK, Shelanski ML, Nunez J (1992) Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4378-4381.
- Cowan CM, Bossing T, Page A, Shepherd D, Mudher A Soluble hyper-phosphorylated tau causes microtubule breakdown and functionally compromises normal tau in vivo. *Acta Neuropathol*.
- Cox PA, Sacks OW (2002) Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58:956-959.
- Crampton N, Kodiha M, Shrivastava S, Umar R, Stochaj U (2009) Oxidative stress inhibits nuclear protein export by multiple mechanisms that target FG nucleoporins and Crm1. *Mol Biol Cell* 20:5106-5116.
- Crowther RA, Olesen OF, Smith MJ, Jakes R, Goedert M (1994) Assembly of Alzheimer-like filaments from full-length tau protein. *FEBS Lett* 337:135-138.

Cummings JL, Benson DF (1984) Subcortical dementia. Review of an emerging concept. *Arch Neurol* 41:874-879.

D

Daly NL, Hoffmann R, Otvos L, Jr., Craik DJ (2000) Role of phosphorylation in the conformation of tau peptides implicated in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 39:9039-9046.

Daniel S, Bradley G, Longshaw VM, Soti C, Csermely P, Blatch GL (2008) Nuclear translocation of the phosphoprotein Hop (Hsp70/Hsp90 organizing protein) occurs under heat shock, and its proposed nuclear localization signal is involved in Hsp90 binding. *Biochim Biophys Acta* 1783:1003-1014.

Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 78:151-164.

Davis DR, Anderton BH, Brion JP, Reynolds CH, Hanger DP (1997) Oxidative stress induces dephosphorylation of tau in rat brain primary neuronal cultures. *J Neurochem* 68:1590-1597.

Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114:1179-1187.

DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457-464.

Delacourte A, Robitaille Y, Sergeant N, Buee L, Hof PR, Wattez A, Laroche-Chollette A, Mathieu J, Chagnon P, Gauvreau D (1996) Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:159-168.

Delacourte A, David JP, Sergeant N, Buee L, Wattez A, Vermersch P, Ghazali F, Fallet-Bianco C, Pasquier F, Lebert F, Petit H, Di Menza C (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52:1158-1165.

Delatour B, Mercken L, El Hachimi KH, Colle MA, Pradier L, Duyckaerts C (2001) FE65 in Alzheimer's disease: neuronal distribution and association with neurofibrillary tangles. *Am J Pathol* 158:1585-1591.

- Derkinderen P, Scales TM, Hanger DP, Leung KY, Byers HL, Ward MA, Lenz C, Price C, Bird IN, Perera T, Kellie S, Williamson R, Noble W, Van Etten RA, Leroy K, Brion JP, Reynolds CH, Anderton BH (2005) Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci* 25:6584-6593.
- Ding H, Dolan PJ, Johnson GV (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 106:2119-2130.
- DiTella MC, Feiguin F, Carri N, Kosik KS, Caceres A (1996) MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109 (Pt 2):467-477.
- Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur EL (2008) Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319:1086-1089.
- Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:721-726.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3:1141-1154.
- Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E (1992) Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J* 11:2131-2138.
- Drewes G, Mandelkow EM, Baumann K, Goris J, Merlevede W, Mandelkow E (1993) Dephosphorylation of tau protein and Alzheimer paired helical filaments by calcineurin and phosphatase-2A. *FEBS Lett* 336:425-432.
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G, Meyer HE, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem* 270:7679-7688.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89:297-308.

D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD (1999) Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5598-5603.

Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 118:5-36.

E

Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143:777-794.

Ekinci FJ, Shea TB (2000) Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol* 20:497-508.

F

Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, De Angelis R, Iezzi S, Iacobini C, Floridi A, Passananti C (2000) Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *Faseb J* 14:904-912.

Farah CA, Perreault S, Liazoghli D, Desjardins M, Anton A, Lauzon M, Paiement J, Leclerc N (2006) Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 63:710-724.

Feany MB, Dickson DW (1995) Widespread cytoskeletal pathology characterizes corticobasal degeneration. *Am J Pathol* 146:1388-1396.

Feng Q, Cheng B, Yang R, Sun FY, Zhu CQ (2005) Dynamic changes of phosphorylated tau in mouse hippocampus after cold water stress. *Neurosci Lett* 388:13-16.

Ferreira A, Busciglio J, Caceres A (1987) An immunocytochemical analysis of the ontogeny of the microtubule-associated proteins MAP-2 and Tau in the nervous system of the rat. *Brain Res* 431:9-31.

- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M (2005) Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366:2112-2117.
- Fischer D, Mukrasch MD, Biernat J, Bibow S, Blackledge M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009) Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules. *Biochemistry* 48:10047-10055.
- Flament S, Delacourte A, Verny M, Hauw JJ, Javoy-Agid F (1991) Abnormal Tau proteins in progressive supranuclear palsy. Similarities and differences with the neurofibrillary degeneration of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol* 81:591-596.
- Fox NC, Freeborough PA, Rossor MN (1996) Visualisation and quantification of rates of atrophy in Alzheimer's disease. *Lancet* 348:94-97.
- Frenkiel-Krispin D, Sack R, Englander J, Shimoni E, Eisenstein M, Bullitt E, Horowitz-Scherer R, Hayes CS, Setlow P, Minsky A, Wolf SG (2004) Structure of the DNA-SspC complex: implications for DNA packaging, protection, and repair in bacterial spores. *J Bacteriol* 186:3525-3530.
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI (2009) Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 284:12845-12852.
- Furuta A, Iida T, Nakabeppu Y, Iwaki T (2001) Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease. *Neuroreport* 12:2895-2899.

G

- Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR (1998) Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 71:2034-2040.
- Galas MC, Dourlen P, Begard S, Ando K, Blum D, Hamdane M, Buee L (2006) The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J Biol Chem* 281:19296-19304.
- Garcia-Sierra F, Mondragon-Rodriguez S, Basurto-Islas G (2008) Truncation of tau protein and its pathological significance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 14:401-409.
- Gendron TF, Petrucelli L (2009) The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4:13.

- Georgieff IS, Liem RK, Couchie D, Mavilia C, Nunez J, Shelanski ML (1993) Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* 105 (Pt 3):729-737.
- Giavara S, Kosmidou E, Hande MP, Bianchi ME, Morgan A, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP (2005) Yeast Nhp6A/B and mammalian Hmgb1 facilitate the maintenance of genome stability. *Curr Biol* 15:68-72.
- Gill SR, Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW (1991) Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 115:1639-1650.
- Ginsberg SD, Crino PB, Lee VM, Eberwine JH, Trojanowski JQ (1997) Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques. *Ann Neurol* 41:200-209.
- Giovannelli L, Decorosi F, Dolara P, Pulvirenti L (2003) Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Res* 969:244-247.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120:885-890.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349:704-706.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989a) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3:519-526.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA (1989b) Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 8:393-399.
- Goedert M, Jakes R (1990) Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* 9:4225-4230.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA (1992) Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8:159-168.

- Goedert M, Jakes R, Qi Z, Wang JH, Cohen P (1995) Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 65:2804-2807.
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA (1996) Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 383:550-553.
- Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P (1997) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Lett* 409:57-62.
- Goldsbury C, Mocanu MM, Thies E, Kaether C, Haass C, Keller P, Biernat J, Mandelkow E, Mandelkow EM (2006) Inhibition of APP trafficking by tau protein does not increase the generation of amyloid-beta peptides. *Traffic* 7:873-888.
- Gómez de Barreda E, Dawson HN, Vitek MP, Avila J (2010) Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression. *FEBS Letters* xxx xxx-xxx.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16:4491-4500.
- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 65:732-738.
- Gong CX, Lidsky T, Wegiel J, Zuck L, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 275:5535-5544.
- Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2005) Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 112:813-838.
- Gonzalez-Billault C, Engelke M, Jimenez-Mateos EM, Wandosell F, Caceres A, Avila J (2002) Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 67:713-719.
- Goode BL, Feinstein SC (1994) Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124:769-782.

- Graeber MB, Mehraein P (1999) Reanalysis of the first case of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3:10-13.
- Graves PR, Lovly CM, Uy GL, Piwnica-Worms H (2001) Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* 20:1839-1851.
- Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV (1994) Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 269:4373-4380.
- Greenwood JA, Johnson GV (1995) Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res* 220:332-337.
- Griffith LM, Pollard TD (1982a) Cross-linking of actin filament networks by self-association and actin-binding macromolecules. *J Biol Chem* 257:9135-9142.
- Griffith LM, Pollard TD (1982b) The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 257:9143-9151.
- Grover A, Houlden H, Baker M, Adamson J, Lewis J, Prihar G, Pickering-Brown S, Duff K, Hutton M (1999) 5' splice site mutations in tau associated with the inherited dementia FTDP-17 affect a stem-loop structure that regulates alternative splicing of exon 10. *J Biol Chem* 274:15134-15143.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986a) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986b) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.
- Gu Y, Oyama F, Ihara Y (1996) Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem* 67:1235-1244.
- Guillozet-Bongaarts AL, Glajch KE, Libson EG, Cahill ME, Bigio E, Berry RW, Binder LI (2007) Phosphorylation and cleavage of tau in non-AD tauopathies. *Acta Neuropathol* 113:513-520.
- Guinez C, Morelle W, Michalski JC, Lefebvre T (2005) O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol* 37:765-774.
- Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1994) Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 33:9511-9522.

H

- Haltiwanger RS, Busby S, Grove K, Li S, Mason D, Medina L, Moloney D, Philipsberg G, Scartozzi R (1997) O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun* 231:237-242.
- Hamdane M, Dourlen P, Bretteville A, Sambo AV, Ferreira S, Ando K, Kerdraon O, Begard S, Geay L, Lippens G, Sergeant N, Delacourte A, Maurage CA, Galas MC, Buee L (2006) Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 32:155-160.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488-491.
- Hartzler AW, Zhu X, Siedlak SL, Castellani RJ, Avila J, Perry G, Smith MA (2002) The p38 pathway is activated in Pick disease and progressive supranuclear palsy: a mechanistic link between mitogenic pathways, oxidative stress, and tau. *Neurobiol Aging* 23:855-859.
- Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y (1992) Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 267:17047-17054.
- Hasegawa M, Watanabe A, Takio K, Suzuki M, Arai T, Titani K, Ihara Y (1993) Characterization of two distinct monoclonal antibodies to paired helical filaments: further evidence for fetal-type phosphorylation of the tau in paired helical filaments. *J Neurochem* 60:2068-2077.
- Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VM, Ihara Y, Goedert M (1996) Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* 384:25-30.
- He HJ, Wang XS, Pan R, Wang DL, Liu MN, He RQ (2009) The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin. *BMC Cell Biol* 10:81.
- Himmler A (1989a) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9:1389-1396.
- Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW, Jr. (1989b) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9:1381-1388.
- Hirano A, Kurland LT, Kuroth RS, Lessell S (1961) Parkinsonism-dementia complex, an endemic disease on the island of Guam. I. Clinical features. *Brain* 84:642-661.

- Hirokawa N, Shiomura Y, Okabe S (1988) Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107:1449-1459.
- Hirokawa N, Sato-Yoshitake R, Kobayashi N, Pfister KK, Bloom GS, Brady ST (1991) Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *J Cell Biol* 114:295-302.
- Hof PR, Knabe R, Bovier P, Bouras C (1991a) Neuropathological observations in a case of autism presenting with self-injury behavior. *Acta Neuropathol* 82:321-326.
- Hof PR, Perl DP, Loerzel AJ, Morrison JH (1991b) Neurofibrillary tangle distribution in the cerebral cortex of parkinsonism-dementia cases from Guam: differences with Alzheimer's disease. *Brain Res* 564:306-313.
- Hof PR, Charpiot A, Delacourte A, Buee L, Purohit D, Perl DP, Bouras C (1992) Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism. *Neurosci Lett* 139:10-14.
- Hoffmann R, Lee VM, Leight S, Varga I, Otvos L, Jr. (1997) Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 36:8114-8124.
- Hong M, Chen DC, Klein PS, Lee VM (1997) Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 272:25326-25332.
- Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, Wszolek Z, Reed L, Miller BI, Geschwind DH, Bird TD, McKeel D, Goate A, Morris JC, Wilhelmsen KC, Schellenberg GD, Trojanowski JQ, Lee VM (1998) Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282:1914-1917.
- Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL, Reynolds MR, Carroll CA, Weintraub ST, Bennett DA, Cryns VL, Berry RW, Binder LI (2004) Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:7895-7902.
- Hoshi M, Nishida E, Miyata Y, Sakai H, Miyoshi T, Ogawara H, Akiyama T (1987) Protein kinase C phosphorylates tau and induces its functional alterations. *FEBS Lett* 217:237-241.
- Hoshino A, Fujii H (2007) Nuclear translocation of 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase by cold and osmotic stress. *Cell Stress Chaperones* 12:186-191.
- Hua Q, He RQ (2002) Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett* 9:349-357.
- Hua Q, He RQ (2003) Tau could protect DNA double helix structure. *Biochim Biophys Acta* 1645:205-211.

- Hua Y, Hisano K, Morimoto Y (2010) Effect of mild and moderate hypothermia on hypoxic injury in nearly pure neuronal culture. *J Anesth* 24:726-732.
- Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S, Houlden H, Pickering-Brown S, Chakraverty S, Isaacs A, Grover A, Hackett J, Adamson J, Lincoln S, Dickson D, Davies P, Petersen RC, Stevens M, de Graaff E, Wauters E, van Baren J, Hillebrand M, Joosse M, Kwon JM, Nowotny P, Che LK, Norton J, Morris JC, Reed LA, Trojanowski J, Basun H, Lannfelt L, Neystat M, Fahn S, Dark F, Tannenberg T, Dodd PR, Hayward N, Kwok JB, Schofield PR, Andreadis A, Snowden J, Craufurd D, Neary D, Owen F, Oostra BA, Hardy J, Goate A, van Swieten J, Mann D, Lynch T, Heutink P (1998) Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393:702-705.
- Hwang SC, Jhon DY, Bae YS, Kim JH, Rhee SG (1996) Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 271:18342-18349.

I

- Ignelzi MA, Jr., Miller DR, Soriano P, Maness PF (1994) Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12:873-884.
- Ikegami S, Harada A, Hirokawa N (2000) Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett* 279:129-132.
- Imamoto N, Matsuoka Y, Kurihara T, Kohno K, Miyagi M, Sakiyama F, Okada Y, Tsunasawa S, Yoneda Y (1992) Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J Cell Biol* 119:1047-1061.
- Ingelsson M, Vanmechelen E, Lannfelt L (1996) Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett* 220:9-12.
- Iwatsubo T, Hasegawa M, Ihara Y (1994) Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics. *Acta Neuropathol* 88:129-136.

J

- Jacobsen E, Beach T, Shen Y, Li R, Chang Y (2004) Deficiency of the Mre11 DNA repair complex in Alzheimer's disease brains. *Brain Res Mol Brain Res* 128:1-7.

- Jellinger KA (2009) Absence of alpha-synuclein pathology in postencephalitic parkinsonism. *Acta Neuropathol* 118:371-379.
- Jenkins SM, Johnson GV (1998) Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 9:67-71.
- Jenkins SM, Zinnerman M, Garner C, Johnson GV (2000) Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J* 345 Pt 2:263-270.
- Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P (1997a) Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 48:128-132.
- Jicha GA, Lane E, Vincent I, Otvos L, Jr., Hoffmann R, Davies P (1997b) A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 69:2087-2095.
- Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P (1999) cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 19:7486-7494.
- Jinwal UK, O'Leary JC, 3rd, Borysov SI, Jones JR, Li Q, Koren J, 3rd, Abisambra JF, Vestal GD, Lawson LY, Johnson AG, Blair LJ, Jin Y, Miyata Y, Gestwicki JE, Dickey CA Hsc70 rapidly engages tau after microtubule destabilization. *J Biol Chem* 285:16798-16805.
- Jung D, Filliol D, Mieke M, Rendon A (1993) Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP2 or TAU. *Cell Motil Cytoskeleton* 24:245-255.

K

- Kamemura K, Hart GW (2003) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 73:107-136.
- Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 399:344-349.
- Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, Ding Q, Chen Q, Butterfield DA, Markesbery WR (2005) Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 64:1152-1156.

- Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R (1996) Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner. *J Neurosci* 16:5583-5592.
- Khatoun S, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1994) Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains. *FEBS Lett* 351:80-84.
- Kidd M (1963) Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197:192-193.
- Kim SK, Norden B (1993) Methyl green. A DNA major-groove binding drug. *FEBS Lett* 315:61-64.
- Kins S, Cramer A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM, Gotz J (2001) Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 276:38193-38200.
- Klein C, Kramer EM, Cardine AM, Schraven B, Brandt R, Trotter J (2002) Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci* 22:698-707.
- Knops J, Kosik KS, Lee G, Pardee JD, Cohen-Gould L, McConlogue L (1991) Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes. *J Cell Biol* 114:725-733.
- Knowles R, LeClerc N, Kosik KS (1994) Organization of actin and microtubules during process formation in tau-expressing Sf9 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 28:256-264.
- Kodiha M, Chu A, Lazrak O, Stochaj U (2005) Stress inhibits nucleocytoplasmic shuttling of heat shock protein hsc70. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1034-1041.
- Kodiha M, Banski P, Ho-Wo-Cheong D, Stochaj U (2008) Dissection of the molecular mechanisms that control the nuclear accumulation of transport factors importin-alpha and CAS in stressed cells. *Cell Mol Life Sci* 65:1756-1767.
- Komori T, Shibata N, Kobayashi M, Sasaki S, Iwata M (1998) Inducible nitric oxide synthase (iNOS)-like immunoreactivity in argyrophilic, tau-positive astrocytes in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 95:338-344.
- Kopke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (1993) Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268:24374-24384.

- Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ (1986) Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4044-4048.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.
- Kotoglou P, Kalaitzakis A, Vezyraki P, Tzavaras T, Michalis LK, Dantzer F, Jung JU, Angelidis C (2009) Hsp70 translocates to the nuclei and nucleoli, binds to XRCC1 and PARP-1, and protects HeLa cells from single-strand DNA breaks. *Cell Stress Chaperones* 14:391-406.
- Kovacs GG, Majtenyi K, Spina S, Murrell JR, Gelpi E, Hoftberger R, Fraser G, Crowther RA, Goedert M, Budka H, Ghetti B (2008) White matter tauopathy with globular glial inclusions: a distinct sporadic frontotemporal lobar degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:963-975.
- Kroner Z (2009) The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev* 14:373-379.
- Ksiezak-Reding H, Morgan K, Mattiace LA, Davies P, Liu WK, Yen SH, Weidenheim K, Dickson DW (1994) Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am J Pathol* 145:1496-1508.
- Kulkarni A, Wilson DM, 3rd (2008) The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction. *Am J Hum Genet* 82:539-566.
- Kuret J, Chirita CN, Congdon EE, Kannanayakal T, Li G, Necula M, Yin H, Zhong Q (2005) Pathways of tau fibrillization. *Biochim Biophys Acta* 1739:167-178.

L

- Ladner CJ, Czech J, Maurice J, Lorens SA, Lee JM (1996) Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:924-931.
- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fievet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossu P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanche H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A,

- Lathrop M, Amouyel P (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41:1094-1099.
- Lannuzel A, Hoglinger GU, Verhaeghe S, Gire L, Belson S, Escobar-Khondiker M, Poullain P, Oertel WH, Hirsch EC, Dubois B, Ruberg M (2007) Atypical parkinsonism in Guadeloupe: a common risk factor for two closely related phenotypes? *Brain* 130:816-827.
- Le Corre S, Klafki HW, Plesnila N, Hubinger G, Obermeier A, Sahagun H, Monse B, Seneci P, Lewis J, Eriksen J, Zehr C, Yue M, McGowan E, Dickson DW, Hutton M, Roder HM (2006) An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9673-9678.
- Lebouvier T, Scales TM, Hanger DP, Geahlen RL, Lardeux B, Reynolds CH, Anderton BH, Derkinderen P (2008) The microtubule-associated protein tau is phosphorylated by Syk. *Biochim Biophys Acta* 1783:188-192.
- Ledesma MD, Bonay P, Colaco C, Avila J (1994) Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem* 269:21614-21619.
- Lee G, Neve RL, Kosik KS (1989) The microtubule binding domain of tau protein. *Neuron* 2:1615-1624.
- Lee G, Newman ST, Gard DL, Band H, Panchamoorthy G (1998) Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21):3167-3177.
- Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litersky JM, Bhaskar K, Fang SM, Do LH, Andreadis A, Van Hoesen G, Ksiezak-Reding H (2004) Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2304-2312.
- Lee KS, Bumbaca D, Kosman J, Setlow P, Jedrzejas MJ (2008) Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of *Bacillus* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2806-2811.
- Lefebvre T, Caillet-Boudin ML, Buee L, Delacourte A, Michalski JC (2003a) O-GlcNAc glycosylation and neurological disorders. *Adv Exp Med Biol* 535:189-202.
- Lefebvre T, Ferreira S, Dupont-Wallois L, Bussiere T, Dupire MJ, Delacourte A, Michalski JC, Caillet-Boudin ML (2003b) Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1619:167-176.
- Leroy K, Brion JP (1999) Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain. *J Chem Neuroanat* 16:279-293.

- Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP (2007) Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:43-55.
- Li T, Paudel HK (2006) Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry* 45:3125-3133.
- Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007) Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol* 113:501-511.
- Li H, Wang D (2010) Mild hypothermia improves ischemic brain function via attenuating neuronal apoptosis. *Brain Res*.
- Li H, Lu G, Shi W, Zheng S (2009) Protective effect of moderate hypothermia on severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 26:1905-1909.
- Liang X, Nazarian A, Erdjument-Bromage H, Bornmann W, Tempst P, Resh MD (2001) Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem* 276:30987-30994.
- Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259:5301-5305.
- Ling Y, Morgan K, Kalsheker N (2003) Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 35:1505-1535.
- Litersky JM, Johnson GV (1992) Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J Biol Chem* 267:1563-1568.
- Liu WK, Williams RT, Hall FL, Dickson DW, Yen SH (1995) Detection of a Cdc2-related kinase associated with Alzheimer paired helical filaments. *Am J Pathol* 146:228-238.
- Liu SJ, Zhang JY, Li HL, Fang ZY, Wang Q, Deng HM, Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Wang JZ (2004a) Tau becomes a more favorable substrate for GSK-3 when it is prephosphorylated by PKA in rat brain. *J Biol Chem* 279:50078-50088.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX (2004b) O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10804-10809.
- Liu T, Perry G, Chan HW, Verdile G, Martins RN, Smith MA, Atwood CS (2004c) Amyloid-beta-induced toxicity of primary neurons is dependent upon differentiation-associated increases in tau and cyclin-dependent kinase 5 expression. *J Neurochem* 88:554-563.

- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2005) Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22:1942-1950.
- Liu F, Liang Z, Shi J, Yin D, El-Akkad E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2006) PKA modulates GSK-3 β - and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS Lett* 580:6269-6274.
- Liu GP, Zhang Y, Yao XQ, Zhang CE, Fang J, Wang Q, Wang JZ (2008) Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits protein phosphatase-2A and the underlying mechanisms. *Neurobiol Aging* 29:1348-1358.
- Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2009) Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132:1820-1832.
- Loomis PA, Howard TH, Castleberry RP, Binder LI (1990) Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8422-8426.
- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P Neurodegeneration in an A β -induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5 (2010) *Aging Cell* 9:64-77.
- LoPresti P, Muma NA, De Vries GH (2001) Neu differentiation factor regulates tau protein and mRNA in cultured neonatal oligodendrocytes. *Glia* 35:147-155.
- Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 85:3036-3040.
- Lovestone S, Hartley CL, Pearce J, Anderton BH (1996) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase-3 β in intact mammalian cells: the effects on the organization and stability of microtubules. *Neuroscience* 73:1145-1157.
- Lovestone S, Davis DR, Webster MT, Kaech S, Brion JP, Matus A, Anderton BH (1999) Lithium reduces tau phosphorylation: effects in living cells and in neurons at therapeutic concentrations. *Biol Psychiatry* 45:995-1003.
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP (1999) The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399:784-788.
- Lu M, Kosik KS (2001) Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell* 12:171-184.
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA (2004) Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429:883-891.

- Luna-Munoz J, Chavez-Macias L, Garcia-Sierra F, Mena R (2007) Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 12:365-375.
- Luo MH, Tse SW, Memmott J, Andreadis A (2004) Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *J Neurochem* 90:340-351.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68:2061-2069.

M

- Ma QL, Yang F, Rosario ER, Ubeda OJ, Beech W, Gant DJ, Chen PP, Hudspeth B, Chen C, Zhao Y, Vinters HV, Frautschy SA, Cole GM (2009) Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin. *J Neurosci* 29:9078-9089.
- Maas T, Eidenmuller J, Brandt R (2000) Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 275:15733-15740.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2006) Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res* 54:197-201.
- Mailliot C, Bussiere T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Buee L (1998) Alzheimer-specific epitope of AT100 in transfected cell lines with tau: toward an efficient cell model of tau abnormal phosphorylation. *Neurosci Lett* 255:13-16.
- Mandell JW, Banker GA (1996) A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16:5727-5740.
- Mann DM, Esiri MM (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* 89:169-179.
- Marchini S, Broggin M, Sessa C, D'Incalci M (2001) Development of distamycin-related DNA binding anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 10:1703-1714.
- Markesbery WR, Kryscio RJ, Lovell MA, Morrow JD (2005) Lipid peroxidation is an early event in the brain in amnesic mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 58:730-735.
- Matsuyama SS, Bondareff W (1994) Tau-like immunoreactivity in Alzheimer and control skin fibroblasts. *J Neurosci Res* 39:519-524.

- Matthias P, Yoshida M, Khochbin S (2008) HDAC6 a new cellular stress surveillance factor. *Cell Cycle* 7:7-10.
- Mawal-Dewan M, Henley J, Van de Voorde A, Trojanowski JQ, Lee VM (1994) The phosphorylation state of tau in the developing rat brain is regulated by phosphoprotein phosphatases. *J Biol Chem* 269:30981-30987.
- McCauley MJ, Zimmerman J, Maher LJ, 3rd, Williams MC (2007) HMGB binding to DNA: single and double box motifs. *J Mol Biol* 374:993-1004.
- McMillan P, Korvatska E, Poorkaj P, Evstafjeva Z, Robinson L, Greenup L, Leverenz J, Schellenberg GD, D'Souza I (2008) Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *J Comp Neurol* 511:788-803.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF (1994) Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36:747-751.
- Michel G, Mercken M, Murayama M, Noguchi K, Ishiguro K, Imahori K, Takashima A (1998) Characterization of tau phosphorylation in glycogen synthase kinase-3beta and cyclin dependent kinase-5 activator (p23) transfected cells. *Biochim Biophys Acta* 1380:177-182.
- Miyamoto Y, Saiwaki T, Yamashita J, Yasuda Y, Kotera I, Shibata S, Shigeta M, Hiraoka Y, Haraguchi T, Yoneda Y (2004) Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin alpha and cause a conventional nuclear import block. *J Cell Biol* 165:617-623.
- Mondragon-Rodriguez S, Mena R, Binder LI, Smith MA, Perry G, Garcia-Sierra F (2008) Conformational changes and cleavage of tau in Pick bodies parallel the early processing of tau found in Alzheimer pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:62-75.
- Montpetit V, Clapin DF, Guberman A (1985) Substructure of 20 nm filaments of progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 68:311-318.
- Moraga DM, Nunez P, Garrido J, Maccioni RB (1993) A tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J Neurochem* 61:979-986.
- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Watanabe A, Titani K, Ihara Y (1995a) Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* 16:365-371; discussion 371-380.

- Morishima-Kawashima M, Hasegawa M, Takio K, Suzuki M, Yoshida H, Titani K, Ihara Y (1995b) Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J Biol Chem* 270:823-829.
- Morsch R, Simon W, Coleman PD (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:188-197.
- Mortimer PP (2009) Was encephalitis lethargica a post-influenzal or some other phenomenon? Time to re-examine the problem. *Epidemiol Infect* 137:449-455.
- Motte J, Williams RS (1989) Age-related changes in the density and morphology of plaques and neurofibrillary tangles in Down syndrome brain. *Acta Neuropathol* 77:535-546.
- Mullaart E, Boerrigter ME, Ravid R, Swaab DF, Vijg J (1990) Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 11:169-173.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347.
- Murayama S, Mori H, Ihara Y, Tomonaga M (1990) Immunocytochemical and ultrastructural studies of Pick's disease. *Ann Neurol* 27:394-405.
- Murphy DB, Borisy GG (1975) Association of high-molecular-weight proteins with microtubules and their role in microtubule assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2696-2700.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254:97-99.

N

- Nakamura J, Swenberg JA (1999) Endogenous apurinic/aprimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res* 59:2522-2526.
- Neri LM, Riederer BM, Marugg RA, Capitani S, Martelli AM (1995) Analysis by confocal microscopy of the behavior of heat shock protein 70 within the nucleus and of a nuclear matrix polypeptide during prolonged heat shock response in HeLa cells. *Exp Cell Res* 221:301-310.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387:271-280.

- Nishimura M, Namba Y, Ikeda K, Oda M (1992) Glial fibrillary tangles with straight tubules in the brains of patients with progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 143:35-38.
- Nishimura I, Yang Y, Lu B (2004) PAR-1 kinase plays an initiator role in a temporally ordered phosphorylation process that confers tau toxicity in *Drosophila*. *Cell* 116:671-682.
- Norrby E, Kristensson K (1997) Measles virus in the brain. *Brain Res Bull* 44:213-220.
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:759-767.

O

- Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM (2006) Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem* 281:39413-39423.
- Odetti P, Garibaldi S, Norese R, Angelini G, Marinelli L, Valentini S, Menini S, Traverso N, Zaccheo D, Siedlak S, Perry G, Smith MA, Tabaton M (2000) Lipoperoxidation is selectively involved in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:393-397.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122:86-94.

P

- Padmaraju V, Indi SS, Rao KS (2010) New evidences on Tau-DNA interactions and relevance to neurodegeneration. *Neurochem Int* 57:51-57.
- Papasozomenos SC, Binder LI (1987) Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton* 8:210-226.
- Papasozomenos SC (1996) Heat shock induces rapid dephosphorylation of tau in both female and male rats followed by hyperphosphorylation only in female rats: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 66:1140-1149.
- Paschal BM, Vallee RB (1987) Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330:181-183.

- Patterson JB, Cornu TI, Redwine J, Dales S, Lewicki H, Holz A, Thomas D, Billeter MA, Oldstone MB (2001) Evidence that the hypermutated M protein of a subacute sclerosing panencephalitis measles virus actively contributes to the chronic progressive CNS disease. *Virology* 291:215-225.
- Perez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J (1996) Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: the minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* 67:1183-1190.
- Perez M, Arrasate M, Montejo De Garcini E, Munoz V, Avila J (2001) In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation. *Biochemistry* 40:5983-5991.
- Perez M, Santa-Maria I, Gomez de Barreda E, Zhu X, Cuadros R, Cabrero JR, Sanchez-Madrid F, Dawson HN, Vitek MP, Perry G, Smith MA, Avila J (2009) Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J Neurochem* 109:1756-1766.
- Perry G, Siedlak SL, Richey P, Kawai M, Cras P, Kalaria RN, Galloway PG, Scardina JM, Cordell B, Greenberg BD, et al. (1991) Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 11:3679-3683.
- Pierre M, Nunez J (1983) Multisite phosphorylation of tau proteins from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 115:212-219.
- Pittman AM, Myers AJ, Abou-Sleiman P, Fung HC, Kaleem M, Marlowe L, Duckworth J, Leung D, Williams D, Kilford L, Thomas N, Morris CM, Dickson D, Wood NW, Hardy J, Lees AJ, de Silva R (2005) Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *J Med Genet* 42:837-846.
- Planel E, Bretteville A, Liu L, Virag L, Du AL, Yu WH, Dickson DW, Whittington RA, Duff KE (2009) Acceleration and persistence of neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy following anesthesia. *FASEB J* 23:2595-2604.
- Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:2401-2411.
- Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, Krishnamurthy P, Herman M, Wang L, Schachter JB, Nelson RB, Lau LF, Duff KE (2007) Anesthesia leads to tau

hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27:3090-3097.

Plattner F, Angelo M, Giese KP (2006) The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 281:25457-25465.

Poorkaj P, Bird TD, Wijsman E, Nemens E, Garruto RM, Anderson L, Andreadis A, Wiederholt WC, Raskind M, Schellenberg GD (1998) Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43:815-825.

Probst A, Tolnay M, Langui D, Goedert M, Spillantini MG (1996) Pick's disease: hyperphosphorylated tau protein segregates to the somatoaxonal compartment. *Acta Neuropathol* 92:588-596.

Q

Qian W, Shi J, Yin X, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX, Liu F PP2A regulates tau phosphorylation directly and also indirectly via activating GSK-3beta. *J Alzheimers Dis* 19:1221-1229.

Qu MH, Li H, Tian R, Nie CL, Liu Y, Han BS, He RQ (2004) Neuronal tau induces DNA conformational changes observed by atomic force microscopy. *Neuroreport* 15:2723-2727.

R

Rahman A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2006) PP2B isolated from human brain preferentially dephosphorylates Ser-262 and Ser-396 of the Alzheimer disease abnormally hyperphosphorylated tau. *J Neural Transm* 113:219-230.

Ranum LP, Rasmussen PF, Benzow KA, Koob MD, Day JW (1998) Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus. *Nat Genet* 19:196-198.

Rao KS (1993) Genomic damage and its repair in young and aging brain. *Mol Neurobiol* 7:23-48.

Reina CP, Zhong X, Pittman RN (2010) Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet* 19:235-249.

Rendon A, Jung D, Jancsik V (1990) Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J* 269:555-556.

- Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH (1997) Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* 68:1736-1744.
- Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP, Anderton BH (2008) Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J Biol Chem* 283:18177-18186.
- Richter-Landsberg C, Goldbaum O (2003) Stress proteins in neural cells: functional roles in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 60:337-349.
- Riederer IM, Schiffrin M, Kovari E, Bouras C, Riederer BM (2009) Ubiquitination and cysteine nitrosylation during aging and Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 80:233-241.
- Rocchi A, Orsucci D, Tognoni G, Ceravolo R, Siciliano G (2009) The role of vascular factors in late-onset sporadic Alzheimer's disease. Genetic and molecular aspects. *Curr Alzheimer Res* 6:224-237.
- Roque A, Orrego M, Ponte I, Suau P (2004) The preferential binding of histone H1 to DNA scaffold-associated regions is determined by its C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 32:6111-6119.
- Rossi G, Dalpra L, Crosti F, Lissoni S, Sciacca FL, Catania M, Di Fede G, Mangieri M, Giaccone G, Croci D, Tagliavini F (2008) A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell Cycle* 7:1788-1794.

S

- Sai K, Takagi A, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y (1992) Changes of 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organ DNA during the aging process. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 11:139-143.
- Salib E, Hillier V (1997) Head injury and the risk of Alzheimer's disease: a case control study. *Int J Geriatr Psychiatry* 12:363-368.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309:476-481.

- Sarkar M, Kuret J, Lee G (2008) Two motifs within the tau microtubule-binding domain mediate its association with the hsc70 molecular chaperone. *J Neurosci Res* 86:2763-2773.
- Sato Y, Naito Y, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Endo T (2001) Analysis of N-glycans of pathological tau: possible occurrence of aberrant processing of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 496:152-160.
- Schmidt ML, Zhukareva V, Newell KL, Lee VM, Trojanowski JQ (2001) Tau isoform profile and phosphorylation state in dementia pugilistica recapitulate Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 101:518-524.
- Schmitz C, Materne S, Korr H (1999) Cell-Type-Specific Differences in Age-Related Changes of DNA Repair in the Mouse Brain - Molecular Basis for a New Approach to Understand the Selective Neuronal Vulnerability in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 1:387-407.
- Schoenfeld TA, Obar RA (1994) Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* 151:67-137.
- Scott CW, Fieles A, Sygowski LA, Caputo CB (1993) Aggregation of tau protein by aluminum. *Brain Res* 628:77-84.
- Selden SC, Pollard TD (1983) Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J Biol Chem* 258:7064-7071.
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ (1997) Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem* 167:99-105.
- Sergeant N, David JP, Goedert M, Jakes R, Vermersch P, Buee L, Lefranc D, Wattez A, Delacourte A (1997a) Two-dimensional characterization of paired helical filament-tau from Alzheimer's disease: demonstration of an additional 74-kDa component and age-related biochemical modifications. *J Neurochem* 69:834-844.
- Sergeant N, David JP, Lefranc D, Vermersch P, Wattez A, Delacourte A (1997b) Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett* 412:578-582.
- Sergeant N, Wattez A, Delacourte A (1999) Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms. *J Neurochem* 72:1243-1249.
- Sergeant N, Sablonniere B, Schraen-Maschke S, Ghestem A, Maurage CA, Wattez A, Vermersch P, Delacourte A (2001) Dysregulation of human brain microtubule-

- associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10:2143-2155.
- Seripa D, Panza F, Franceschi M, D'Onofrio G, Solfrizzi V, Dallapiccola B, Pilotto A (2009) Non-apolipoprotein E and apolipoprotein E genetics of sporadic Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* 8:214-236.
- Sestili P, Martinelli C, Stocchi V (2006) The fast halo assay: an improved method to quantify genomic DNA strand breakage at the single-cell level. *Mutat Res* 607:205-214.
- Setlow P (2007) I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol* 15:172-180.
- Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsersky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, et al. (1995) Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270:18917-18922.
- Shanavas A, Papasozomenos SC (2000) tau kinases in the rat heat shock model: possible implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14139-14144.
- Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:765-768.
- Shi Y, Thomas JO (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* 12:2186-2192.
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS (2004a) CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279:4869-4876.
- Shimura H, Miura-Shimura Y, Kosik KS (2004b) Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. *J Biol Chem* 279:17957-17962.
- Simpson JE, Ince PG, Lace G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, Savva G, Brayne C, Wharton SB Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging* 31:578-590.
- Singh TJ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1996) Non-proline-dependent protein kinases phosphorylate several sites found in tau from Alzheimer disease brain. *Mol Cell Biochem* 154:143-151.
- Sjoberg MK, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E (2006) Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J Cell Sci* 119:2025-2034.

- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Bloom GS, Mumby MC (1996) Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron* 17:1201-1207.
- Sontag E, Nunbhakdi-Craig V, Lee G, Brandt R, Kamibayashi C, Kuret J, White CL, 3rd, Mumby MC, Bloom GS (1999) Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *J Biol Chem* 274:25490-25498.
- Sontag E, Luangpirom A, Hladik C, Mudrak I, Ogris E, Speciale S, White CL, 3rd (2004) Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β Alphac enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:287-301.
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN, Robertson RC (1987) Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237:517-522.
- Spencer PS, Ohta M, Palmer VS (1987) Cycad use and motor neurone disease in Kii peninsula of Japan. *Lancet* 2:1462-1463.
- Spencer PS, Palmer VS, Herman A, Asmedi A (1987) Cycad use and motor neurone disease in Irian Jaya. *Lancet* 2:1273-1274.
- Spillantini MG, Murrell JR, Goedert M, Farlow MR, Klug A, Ghetti B (1998) Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7737-7741.
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Geerts H, Mercken M, Bruynseels K, Lasrado R, Vandezande K, Laenen I, Boon T, Van Lint J, Vandenneede J, Moechars D, Loos R, Van Leuven F (2000) Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice. *J Biol Chem* 275:41340-41349.
- Stambolic V, Ruel L, Woodgett JR (1996) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr Biol* 6:1664-1668.
- Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2002) Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156:1051-1063.
- Steele JC, McGeer PL (2008) The ALS/PDC syndrome of Guam and the cycad hypothesis. *Neurology* 70:1984-1990.
- Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Soling HD, Drechsel D, Kirschner MW, et al. (1990) Phosphorylation of microtubule-

- associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺(+)-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *Embo J* 9:3539-3544.
- Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Bruschi RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307:1282-1288.
- Stoothoff W, Jones PB, Spiers-Jones TL, Joyner D, Chhabra E, Bercury K, Fan Z, Xie H, Bacskai B, Edd J, Irimia D, Hyman BT (2009) Differential effect of three-repeat and four-repeat tau on mitochondrial axonal transport. *J Neurochem* 111:417-427.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977-1981.
- T**
- Takahashi M, Tomizawa K, Sato K, Ohtake A, Omori A (1995a) A novel tau-tubulin kinase from bovine brain. *FEBS Lett* 372:59-64.
- Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K, Takamatsu M, Fujita SC, Imahori K (1995b) Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. *J Neurochem* 64:1759-1768.
- Takahashi M, Tsujioka Y, Yamada T, Tsuboi Y, Okada H, Yamamoto T, Liposits Z (1999) Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol* 97:635-641.
- Takahashi M, Weidenheim KM, Dickson DW, Ksiezak-Reding H (2002) Morphological and biochemical correlations of abnormal tau filaments in progressive supranuclear palsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:33-45.
- Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N (2000) Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150:989-1000.
- Takuma H, Arawaka S, Mori H (2003) Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res Dev Brain Res* 142:121-127.
- Tanimukai H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2005) Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 166:1761-1771.
- Tashiro K, Hasegawa M, Ihara Y, Iwatsubo T (1997) Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex. *Neuroreport* 8:2797-2801.

- Tatebayashi Y, Haque N, Tung YC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I (2004) Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci* 117:1653-1663.
- Terry RD (1963) The Fine Structure of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 22:629-642.
- Terry RD, Gonatas NK, Weiss M (1964) Ultrastructural Studies in Alzheimer's Presenile Dementia. *Am J Pathol* 44:269-297.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572-580.
- Terry LJ, Shows EB, Wenthe SR (2007) Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 318:1412-1416.
- Thorpe JR, Morley SJ, Rulten SL (2001) Utilizing the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase pin1 as a probe of its phosphorylated target proteins. Examples of binding to nuclear proteins in a human kidney cell line and to tau in Alzheimer's diseased brain. *J Histochem Cytochem* 49:97-108.
- Thurston VC, Zinkowski RP, Binder LI (1996) Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 105:20-30.
- Tokuda T, Ikeda S, Yanagisawa N, Ihara Y, Glenner GG (1991) Re-examination of ex-boxers' brains using immunohistochemistry with antibodies to amyloid beta-protein and tau protein. *Acta Neuropathol* 82:280-285.
- Trinczek B, Ebner A, Mandelkow EM, Mandelkow E (1999) Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112 (Pt 14):2355-2367.
- Trojanowski JQ, Schuck T, Schmidt ML, Lee VM (1989) Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem* 37:209-215.
- Tsukahara F, Maru Y (2004) Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J Biol Chem* 279:8867-8872.

U

- Udd B, Meola G, Krahe R, Thornton C, Ranum L, Day J, Bassez G, Ricker K (2003) Report of the 115th ENMC workshop: DM2/PROMM and other myotonic dystrophies. 3rd

Workshop, 14-16 February 2003, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 13:589-596.

V

Vale RD, Schnapp BJ, Mitchison T, Steuer E, Reese TS, Sheetz MP (1985) Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 43:623-632.

Vanier MT, Neuville P, Michalik L, Launay JF (1998) Expression of specific tau exons in normal and tumoral pancreatic acinar cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 10):1419-1432.

Vega IE, Cui L, Propst JA, Hutton ML, Lee G, Yen SH (2005) Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Brain Res Mol Brain Res* 138:135-144.

Vershinin M, Carter BC, Razafsky DS, King SJ, Gross SP (2007) Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:87-92.

Vincent I, Rosado M, Davies P (1996) Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J Cell Biol* 132:413-425.

Vogelsberg-Ragaglia V, Schuck T, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol* 168:402-412.

Vulliet R, Halloran SM, Braun RK, Smith AJ, Lee G (1992) Proline-directed phosphorylation of human Tau protein. *J Biol Chem* 267:22570-22574.

W

Wade RH (2009) On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol* 43:177-191.

Wagner U, Utton M, Gallo JM, Miller CC (1996) Cellular phosphorylation of tau by GSK-3 beta influences tau binding to microtubules and microtubule organisation. *J Cell Sci* 109 (Pt 6):1537-1543.

Wang Y, Loomis PA, Zinkowski RP, Binder LI (1993) A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol* 121:257-267.

Wang JZ, Gong CX, Zaidi T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1995) Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J Biol Chem* 270:4854-4860.

- Wang JZ, Wu Q, Smith A, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1998) Tau is phosphorylated by GSK-3 at several sites found in Alzheimer disease and its biological activity markedly inhibited only after it is prephosphorylated by A-kinase. *FEBS Lett* 436:28-34.
- Wang J, Xiong S, Xie C, Markesbery WR, Lovell MA (2005) Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93:953-962.
- Wang J, Markesbery WR, Lovell MA (2006) Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *J Neurochem* 96:825-832.
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2007) Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 25:59-68.
- Watanabe A, Hasegawa M, Suzuki M, Takio K, Morishima-Kawashima M, Titani K, Arai T, Kosik KS, Ihara Y (1993) In vivo phosphorylation sites in fetal and adult rat tau. *J Biol Chem* 268:25712-25717.
- Webb Y, Hermida-Matsumoto L, Resh MD (2000) Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 275:261-270.
- Wei ML, Andreadis A (1998) Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 70:1346-1356.
- Wei Y, Qu MH, Wang XS, Chen L, Wang DL, Liu Y, Hua Q, He RQ (2008) Binding to the minor groove of the double-strand, tau protein prevents DNA from damage by peroxidation. *PLoS One* 3:e2600.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:1858-1862.
- Weisenberg RC (1972) Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177:1104-1105.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344:769-772.
- Whitwell JL, Josephs KA, Murray ME, Kantarci K, Przybelski SA, Weigand SD, Vemuri P, Senjem ML, Parisi JE, Knopman DS, Boeve BF, Petersen RC, Dickson DW, Jack CR, Jr. (2008) MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: a voxel-based morphometry study. *Neurology* 71:743-749.

- Williamson R, Scales T, Clark BR, Gibb G, Reynolds CH, Kellie S, Bird IN, Varndell IM, Sheppard PW, Everall I, Anderton BH (2002) Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J Neurosci* 22:10-20.
- Wilson DM, Binder LI (1997) Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150:2181-2195.
- Witman GB, Cleveland DW, Weingarten MD, Kirschner MW (1976) Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:4070-4074.
- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB (2001) Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293:711-714.
- Wolfe MS (2009) Tau mutations in neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 284:6021-6025.
- Wong CW, Quaranta V, Glenner GG (1985) Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8729-8732.
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 9:2431-2438.
- Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001) The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* 355:609-615.

X

- Xu M, Wright WD, Higashikubo R, Roti JR (1998) Intracellular distribution of hsp70 during long duration moderate hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 14:211-225.
- Xu S, Zhou M, Yu S, Cai Y, Zhang A, Ueda K, Chan P (2006) Oxidative stress induces nuclear translocation of C-terminus of alpha-synuclein in dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342:330-335.

Y

- Yamauchi PS, Purich DL (1993) Microtubule-associated protein interactions with actin filaments: evidence for differential behavior of neuronal MAP-2 and tau in the presence of phosphatidylinositol. *Biochem Biophys Res Commun* 190:710-715.

- Yanagisawa M, Planel E, Ishiguro K, Fujita SC (1999) Starvation induces tau hyperphosphorylation in mouse brain: implications for Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 461:329-333.
- Yang Y, Yang XF, Wang YP, Tian Q, Wang XC, Li HL, Wang Q, Wang JZ (2007) Inhibition of protein phosphatases induces transport deficits and axonopathy. *J Neurochem* 102:878-886.
- Yin H, Kuret J (2006) C-terminal truncation modulates both nucleation and extension phases of tau fibrillization. *FEBS Lett* 580:211-215.
- Yoshida H, Ihara Y (1993) Tau in paired helical filaments is functionally distinct from fetal tau: assembly incompetence of paired helical filament-tau. *J Neurochem* 61:1183-1186.
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM (2007) Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53:337-351.
- Yu JZ, Rasenick MM (2006) Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *Faseb J* 20:1452-1461.
- Yuan A, Kumar A, Peterhoff C, Duff K, Nixon RA (2008) Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci* 28:1682-1687.
- Yuksel D, Yilmaz D, Uyar NY, Senbil N, Gurer Y, Anlar B Tau proteins in the cerebrospinal fluid of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* 32:467-471.
- Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ (2008) A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol* 4:483-490.

Z

- Zambrano CA, Egana JT, Nunez MT, Maccioni RB, Gonzalez-Billault C (2004) Oxidative stress promotes tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1. *Free Radic Biol Med* 36:1393-1402.
- Zhao QL, Fujiwara Y, Kondo T (2006) Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia. *Free Radic Biol Med* 40:1131-1143.
- Zhou XZ, Kops O, Werner A, Lu PJ, Shen M, Stoller G, Kullertz G, Stark M, Fischer G, Lu KP (2000) Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 6:873-883.

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

Annexe

BindN prediction of DNA-binding residues

Summary

Your sequence: sp|P10636-8|TAU_HUMAN Isoform Tau-4 of Microtubule-associated protein tau OS=Homo sapiens GN=MAPT
Input sequence length: 441 amino acids
Predicted binding sites: 122 residues
User-defined specificity: 80.00%
Estimated sensitivity: 56.96%

Overview

Sequence: MAEPRQEFEVMEFHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTP TEDGSEEPG
Prediction: ----+-----+-----++-----+-----+-----+-----
Confidence: 574646799999959724544656424522434887983886843525223634735455

Sequence: SETSDAKSTPTAEDVTAPLVD EGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG
Prediction: +-+++-+++--+-----++-----
Confidence: 436753755247459298999879556456526335753822657997642538978988

Sequence: HVTQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPQKGOANATRIPAKTPPAPK
Prediction: ---+--++-----+-+---++-+---+++--+-+-----+-+---+-+---+---
Confidence: 364539256868535462356654325758338395445342846344794435825328

Sequence: TPPSSGEPPKSGDRSGYSDPGD PGEPGSRSREPDLPPTREPKKVAVVREPPKDPSSAK
Prediction: +++++-+--+-+--+-----+++++-----+-----+-----+-----+-+--
Confidence: 866782422572296362536955323795922454622794354776864562228838

Sequence: SRLQTAPVPM PDLK NVKSKIGSTENLKHQPGGK VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
Prediction: +-+-+-----++-+++--+-----+-+-----+-+-----+-+-----+-+-----
Confidence: 79358748656675465673277226223546674564347574473562368328338

Sequence: PGGGSVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIH HKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNI
Prediction: ----+-----++-+++--+-----+-----+-----+-+-----+-+-----
Confidence: 455666257234854795677325663853536572727545477525772725426649

Sequence: THVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKDPV VSGDTPRHL SNVSS TGSIDMV
Prediction: -----++--+--+--+--+--+--+-----+-----+-----+-----+-----
Confidence: 348464426953625742825565584488998327478254253824654757348869

Sequence: DSPQLATLADEVSASLAKOGL
Prediction: -----+-----+-----
Confidence: 926398388659452557367

*** Prediction: binding residues are labeled with '+' and in red; non-binding residues labeled with '-' and in green.
*** Confidence: from level 0 (lowest) to level 9 (highest).

Details

<u>Position</u>	<u>Residue</u>	<u>SVM Output</u>	<u>Prediction*</u>	<u>Confidence**</u>
1	M	-0.6034	-	0.5131
2	A	-1.1052	-	0.7452
3	E	-0.4262	-	0.4369
4	P	-0.9774	-	0.6823
5	R	0.5335	+	0.4931
6	Q	-0.8462	-	0.6191
7	E	-1.0572	-	0.7200
8	F	-1.5745	-	0.9212
9	E	-1.6820	-	0.9472
10	V	-2.1632	-	0.9903
11	M	-1.8088	-	0.9700
12	E	-1.7193	-	0.9536
13	D	-1.5711	-	0.9208
14	H	-0.7701	-	0.5834
15	A	-1.5388	-	0.9123
16	G	-1.1358	-	0.7578
17	T	0.2844	-	0.2236
18	Y	0.4408	+	0.4507
19	G	-0.7818	-	0.5881
20	L	-0.4413	-	0.4436
21	G	-0.4025	-	0.4273
22	D	-1.0010	-	0.6948
23	R	0.6905	+	0.5604
24	K	0.7712	+	0.6055
25	D	-0.4248	-	0.4361
26	Q	0.2937	-	0.2214
27	G	-0.4176	-	0.4328
28	G	-0.6426	-	0.5269
29	Y	0.3224	-	0.2142
30	T	0.3536	-	0.2058
31	M	-0.3656	-	0.4147
32	H	-0.1675	-	0.3459
33	Q	-0.3996	-	0.4262
34	D	-1.4230	-	0.8747
35	Q	-1.2534	-	0.8080
36	E	-1.0705	-	0.7281
37	G	-1.5867	-	0.9239
38	D	-1.3630	-	0.8514
39	T	-0.2707	-	0.3825
40	D	-1.3040	-	0.8269
41	A	-1.2766	-	0.8161
42	G	-0.9865	-	0.6864
43	L	-1.2890	-	0.8208
44	K	0.3939	+	0.4350
45	E	-0.2340	-	0.3673
46	S	0.5973	+	0.5189
47	P	0.2388	-	0.2328
48	L	-0.7018	-	0.5523
49	Q	0.0330	-	0.2866
50	T	0.0683	-	0.2775
51	P	-0.2478	-	0.3731
52	T	0.8456	+	0.6525
53	E	-0.0877	-	0.3197
54	D	-0.4522	-	0.4494
55	G	-1.2224	-	0.7953
56	S	-0.1175	-	0.3305
57	E	-0.6321	-	0.5220
58	E	-0.4745	-	0.4592
59	P	-0.5932	-	0.5097
60	G	-0.6721	-	0.5392
61	S	0.4639	+	0.4590
62	E	-0.0575	-	0.3127

63	T	0.7663	+	0.6018
64	S	0.9663	+	0.7060
65	D	0.6241	+	0.5290
66	A	-0.0891	-	0.3206
67	K	1.0146	+	0.7373
68	S	0.7472	+	0.5908
69	T	0.7136	+	0.5751
70	P	0.2002	-	0.2439
71	T	0.5129	+	0.4839
72	A	-1.0494	-	0.7167
73	E	-0.3938	-	0.4239
74	D	-0.6967	-	0.5500
75	V	-1.5796	-	0.9223
76	T	0.0736	-	0.2758
77	A	-1.5701	-	0.9202
78	P	-1.3327	-	0.8403
79	L	-1.7668	-	0.9630
80	V	-1.7942	-	0.9669
81	D	-1.7276	-	0.9550
82	E	-1.2527	-	0.8075
83	G	-1.1962	-	0.7836
84	A	-1.5700	-	0.9200
85	P	-0.6141	-	0.5164
86	G	-0.6751	-	0.5409
87	K	0.8804	+	0.6664
88	Q	0.4737	+	0.4618
89	A	-0.6643	-	0.5358
90	A	-0.8400	-	0.6159
91	A	-0.8004	-	0.5975
92	Q	0.0396	-	0.2841
93	P	-0.9159	-	0.6503
94	H	-0.2637	-	0.3792
95	T	-0.1933	-	0.3545
96	E	-0.6369	-	0.5245
97	I	-1.0454	-	0.7148
98	P	-0.5913	-	0.5095
99	E	-0.3119	-	0.3962
100	G	-1.3960	-	0.8647
101	T	0.0462	-	0.2823
102	T	0.2661	-	0.2283
103	A	-0.8524	-	0.6211
104	E	-0.7947	-	0.5948
105	E	-1.0318	-	0.7083
106	A	-1.6981	-	0.9502
107	G	-1.7603	-	0.9616
108	I	-1.1645	-	0.7684
109	G	-1.0094	-	0.6994
110	D	-0.5122	-	0.4745
111	T	0.0563	-	0.2797
112	P	-0.7108	-	0.5552
113	S	-0.1462	-	0.3387
114	L	-1.2385	-	0.8019
115	E	-1.5558	-	0.9172
116	D	-1.1965	-	0.7836
117	E	-1.4657	-	0.8897
118	A	-1.8587	-	0.9777
119	A	-1.3723	-	0.8561
120	G	-1.2641	-	0.8117
121	H	-0.1220	-	0.3322
122	V	-0.8512	-	0.6209
123	T	0.4942	+	0.4756
124	Q	0.7012	+	0.5641
125	A	-0.2642	-	0.3800
126	R	1.9166	+	0.9788
127	M	0.0571	-	0.2791

128	V	-0.5860	-	0.5077
129	S	0.8261	+	0.6341
130	K	1.3919	+	0.8876
131	S	0.9276	+	0.6931
132	K	1.3822	+	0.8866
133	D	0.6322	+	0.5355
134	G	-0.1951	-	0.3552
135	T	0.7186	+	0.5770
136	G	-0.3952	-	0.4245
137	S	0.8294	+	0.6359
138	D	0.1160	-	0.2650
139	D	-0.2944	-	0.3892
140	K	0.6732	+	0.5530
141	K	0.8340	+	0.6406
142	A	-0.9141	-	0.6500
143	K	0.5748	+	0.5069
144	G	-0.3796	-	0.4191
145	A	-0.3000	-	0.3914
146	D	-0.0100	-	0.2981
147	G	-0.6714	-	0.5387
148	K	0.9790	+	0.7161
149	T	0.6486	+	0.5419
150	K	1.2888	+	0.8645
151	I	-0.2981	-	0.3908
152	A	-0.2666	-	0.3809
153	T	1.2031	+	0.8369
154	P	-0.2953	-	0.3898
155	R	1.6951	+	0.9539
156	G	-0.5708	-	0.5011
157	A	-0.3556	-	0.4109
158	A	-0.4996	-	0.4711
159	P	-0.5841	-	0.5072
160	P	-0.0878	-	0.3197
161	G	-0.3855	-	0.4212
162	Q	0.3376	-	0.2102
163	K	1.2206	+	0.8424
164	G	-0.3671	-	0.4155
165	Q	0.9146	+	0.6885
166	A	-0.3168	-	0.3975
167	N	0.4469	+	0.4525
168	A	-0.5494	-	0.4911
169	T	1.0852	+	0.7714
170	R	1.8837	+	0.9751
171	I	-0.3303	-	0.4023
172	P	0.4842	+	0.4682
173	A	-0.3085	-	0.3948
174	K	0.6899	+	0.5604
175	T	1.2349	+	0.8461
176	P	0.3717	-	0.2005
177	P	0.6705	+	0.5521
178	A	-0.1316	-	0.3344
179	P	0.2243	-	0.2369
180	K	1.3449	+	0.8829
181	T	1.4000	+	0.8903
182	P	0.9012	+	0.6783
183	P	0.8019	+	0.6240
184	S	1.0849	+	0.7714
185	S	1.1498	+	0.8065
186	G	0.2171	-	0.2383
187	E	0.4251	+	0.4442
188	P	0.2580	-	0.2291
189	P	0.0042	-	0.2942
190	K	0.6420	+	0.5392
191	S	0.9715	+	0.7088
192	G	0.3117	-	0.2175

193	D	0.1083	-	0.2677
194	R	1.4685	+	0.9124
195	S	0.7678	+	0.6028
196	G	-0.3015	-	0.3917
197	Y	0.8748	+	0.6618
198	S	0.3551	-	0.2055
199	D	-0.7329	-	0.5636
200	P	-0.1989	-	0.3562
201	G	-1.0078	-	0.6983
202	D	-1.6008	-	0.9269
203	P	-0.6304	-	0.5212
204	G	-0.6614	-	0.5348
205	E	-0.0534	-	0.3120
206	P	0.2230	-	0.2370
207	G	-0.0238	-	0.3019
208	S	0.9514	+	0.7014
209	R	1.6984	+	0.9539
210	S	0.7573	+	0.5972
211	R	1.5247	+	0.9290
212	E	0.2766	-	0.2255
213	P	0.1184	-	0.2647
214	D	-0.4779	-	0.4606
215	L	-0.7207	-	0.5587
216	P	-0.4238	-	0.4358
217	T	0.8413	+	0.6479
218	P	0.2531	-	0.2298
219	P	0.0061	-	0.2928
220	T	1.0394	+	0.7484
221	R	1.4728	+	0.9134
222	E	0.3788	+	0.4323
223	P	-0.2093	-	0.3598
224	K	0.5986	+	0.5189
225	K	0.4467	+	0.4525
226	V	-1.1358	-	0.7578
227	A	-1.0672	-	0.7269
228	V	-0.9761	-	0.6820
229	V	-1.2815	-	0.8177
230	R	0.7835	+	0.6138
231	E	-0.5676	-	0.4994
232	P	-0.6614	-	0.5348
233	P	-0.9064	-	0.6464
234	K	0.1808	-	0.2487
235	D	0.1658	-	0.2533
236	P	0.0293	-	0.2877
237	S	1.1386	+	0.8000
238	S	1.1425	+	0.8028
239	A	-0.0423	-	0.3086
240	K	1.2481	+	0.8507
241	S	1.1076	+	0.7797
242	R	1.8351	+	0.9687
243	L	-0.1167	-	0.3303
244	Q	0.6160	+	0.5272
245	T	1.1448	+	0.8046
246	A	-1.1302	-	0.7561
247	P	-0.4751	-	0.4598
248	V	-1.2462	-	0.8050
249	P	-0.9473	-	0.6662
250	M	-0.5743	-	0.5033
251	P	-0.8083	-	0.6020
252	D	-0.8155	-	0.6064
253	L	-1.0558	-	0.7192
254	K	0.6810	+	0.5576
255	N	0.4833	+	0.4682
256	V	-0.9728	-	0.6806
257	K	0.6457	+	0.5410

258	S	0.8210	+	0.6332
259	K	1.0902	+	0.7742
260	I	-0.0890	-	0.3203
261	G	0.0310	-	0.2867
262	S	0.9769	+	0.7134
263	T	0.9518	+	0.7014
264	E	0.3577	-	0.2052
265	N	0.3379	-	0.2102
266	L	-0.9543	-	0.6706
267	K	0.3500	-	0.2066
268	H	0.1142	-	0.2656
269	Q	0.0843	-	0.2734
270	P	-0.1243	-	0.3328
271	G	-0.7264	-	0.5609
272	G	-0.3938	-	0.4239
273	G	-0.8066	-	0.6006
274	K	0.7862	+	0.6147
275	V	-1.1958	-	0.7834
276	Q	0.3741	+	0.4304
277	I	-0.7411	-	0.5692
278	I	-0.9992	-	0.6937
279	N	-0.3781	-	0.4186
280	K	-0.2174	-	0.3630
281	K	0.5264	+	0.4885
282	L	-1.2142	-	0.7914
283	D	-0.7220	-	0.5591
284	L	-1.0407	-	0.7122
285	S	0.5157	+	0.4848
286	N	0.5424	+	0.4977
287	V	-1.1439	-	0.7600
288	Q	-0.0521	-	0.3114
289	S	0.6564	+	0.5475
290	K	0.9053	+	0.6811
291	C	0.2905	-	0.2225
292	G	-0.2208	-	0.3642
293	S	0.8557	+	0.6562
294	K	1.2087	+	0.8406
295	D	-0.1970	-	0.3559
296	N	0.0045	-	0.2942
297	I	-1.4423	-	0.8823
298	K	-0.0228	-	0.3019
299	H	-0.2196	-	0.3639
300	V	-1.2526	-	0.8075
301	P	-0.5564	-	0.4936
302	G	-0.8044	-	0.5994
303	G	-0.6089	-	0.5147
304	G	-0.9263	-	0.6564
305	S	0.8599	+	0.6571
306	V	-0.8742	-	0.6316
307	Q	0.3552	-	0.2055
308	I	-0.7169	-	0.5570
309	V	-1.1252	-	0.7539
310	Y	0.0881	-	0.2723
311	K	-0.1550	-	0.3423
312	P	-0.3440	-	0.4066
313	V	-1.2494	-	0.8059
314	D	-0.5731	-	0.5030
315	L	-0.5027	-	0.4720
316	S	1.0883	+	0.7733
317	K	1.4263	+	0.9005
318	V	-0.7559	-	0.5759
319	T	0.8048	+	0.6267
320	S	1.0661	+	0.7613
321	K	1.0346	+	0.7447
322	C	-0.0756	-	0.3169

323	G	0.1139	-	0.2661
324	S	0.7446	+	0.5889
325	L	-0.9250	-	0.6553
326	G	-0.8704	-	0.6287
327	N	-0.1096	-	0.3284
328	I	-1.3911	-	0.8639
329	H	-0.5726	-	0.5027
330	H	-0.2338	-	0.3673
331	K	0.6133	+	0.5263
332	P	-0.2195	-	0.3639
333	G	-0.9891	-	0.6887
334	G	-0.7797	-	0.5873
335	G	-1.0485	-	0.7166
336	Q	0.1644	-	0.2534
337	V	-1.1493	-	0.7631
338	E	0.0221	-	0.2894
339	V	-1.0898	-	0.7372
340	K	0.5605	+	0.5041
341	S	0.3877	+	0.4341
342	E	-0.6012	-	0.5123
343	K	0.5455	+	0.4977
344	L	-1.1774	-	0.7758
345	D	-1.0697	-	0.7278
346	F	-0.6611	-	0.5348
347	K	0.2811	-	0.2241
348	D	-0.6341	-	0.5233
349	R	1.1312	+	0.7935
350	V	-1.1415	-	0.7597
351	Q	0.1007	-	0.2697
352	S	0.9651	+	0.7051
353	K	0.3274	-	0.2122
354	I	-0.6801	-	0.5433
355	G	-0.5193	-	0.4778
356	S	0.2720	-	0.2273
357	L	-0.8580	-	0.6237
358	D	-0.8412	-	0.6167
359	N	-0.5502	-	0.4914
360	I	-1.6403	-	0.9373
361	T	-0.1698	-	0.3466
362	H	-0.3878	-	0.4222
363	V	-1.2568	-	0.8092
364	P	-0.3567	-	0.4111
365	G	-0.9447	-	0.6652
366	G	-0.4522	-	0.4494
367	G	-0.3601	-	0.4125
368	N	0.2156	-	0.2387
369	K	0.7708	+	0.6055
370	K	1.4566	+	0.9088
371	I	-0.6683	-	0.5372
372	E	-0.2556	-	0.3762
373	T	0.9232	+	0.6931
374	H	0.1370	-	0.2603
375	K	0.7216	+	0.5788
376	L	-1.0320	-	0.7089
377	T	0.5518	+	0.4995
378	F	-0.0124	-	0.2986
379	R	1.1763	+	0.8230
380	E	0.2685	-	0.2278
381	N	0.5534	+	0.5005
382	A	-0.7482	-	0.5728
383	K	0.8511	+	0.6553
384	A	-0.7667	-	0.5820
385	K	0.7438	+	0.5889
386	T	1.2256	+	0.8433
387	D	-0.4247	-	0.4361

388	H	-0.3792	-	0.4191
389	G	-1.2514	-	0.8072
390	A	-1.4683	-	0.8908
391	E	-1.6698	-	0.9444
392	I	-1.5885	-	0.9242
393	V	-1.4521	-	0.8852
394	Y	-0.1534	-	0.3411
395	K	0.2812	-	0.2241
396	D	-1.1016	-	0.7433
397	P	-0.4949	-	0.4692
398	V	-1.2152	-	0.7917
399	V	-1.4828	-	0.8959
400	S	0.3485	-	0.2069
401	G	-0.7935	-	0.5947
402	D	-0.4543	-	0.4509
403	T	0.1624	-	0.2537
404	D	-0.7386	-	0.5673
405	P	-0.2400	-	0.3695
406	R	1.2602	+	0.8535
407	H	0.0859	-	0.2730
408	L	-0.5457	-	0.4891
409	S	0.8514	+	0.6553
410	N	0.6643	+	0.5493
411	V	-0.4872	-	0.4661
412	S	0.9848	+	0.7207
413	S	0.6936	+	0.5622
414	T	1.0090	+	0.7364
415	G	-0.3125	-	0.3966
416	S	0.4316	+	0.4470
417	I	-1.3087	-	0.8297
418	D	-1.2657	-	0.8120
419	M	-0.8742	-	0.6316
420	V	-1.6310	-	0.9352
421	D	-1.6963	-	0.9498
422	S	0.1585	-	0.2550
423	P	-0.8601	-	0.6244
424	Q	-0.2506	-	0.3744
425	L	-1.5438	-	0.9136
426	A	-1.3080	-	0.8297
427	T	-0.2619	-	0.3784
428	L	-1.3501	-	0.8466
429	A	-1.4861	-	0.8972
430	D	-0.9217	-	0.6525
431	E	-0.7843	-	0.5892
432	V	-1.9236	-	0.9828
433	S	0.4356	+	0.4498
434	A	-0.7294	-	0.5622
435	S	0.3566	-	0.2055
436	L	-0.6999	-	0.5516
437	A	-0.7588	-	0.5772
438	K	0.9774	+	0.7152
439	Q	-0.0668	-	0.3147
440	G	-0.8329	-	0.6123
441	L	-1.0253	-	0.7056

* The output threshold used for prediction is 0.3725.

** The confidence value is (1 - sensitivity) for positive predictions,
and (1 - specificity) for negative predictions.