



HAL
open science

**Modélisation et étude des mécanismes moléculaires de la
dégénérescence neurofibrillaire : vers la compréhension
d'une mort neuronale liée à la dysfonction des protéines
Tau**

Alexis Bretteville

► **To cite this version:**

Alexis Bretteville. Modélisation et étude des mécanismes moléculaires de la dégénérescence neurofibrillaire : vers la compréhension d'une mort neuronale liée à la dysfonction des protéines Tau. Neurosciences [q-bio.NC]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2007. Français. NNT : 2007LIL2S020 . tel-00702281

HAL Id: tel-00702281

<https://theses.hal.science/tel-00702281v1>

Submitted on 30 May 2012

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
École Doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

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

Spécialité : neurosciences

Présentée par

Alexis BRETTEVILLE

**Modélisation et étude des mécanismes moléculaires de la
dégénérescence neurofibrillaire : vers la compréhension d'une mort
neuronale liée à la dysfonction des protéines Tau**

Soutenue publiquement le 29 octobre 2007 devant le Jury composé de :

M. le Dr C. BOURAS , Professeur, Université de Genève, Suisse	Rapporteur
M. le Dr A. BUISSON , Professeur, Université de Caen Basse-Normandie, France	Rapporteur
M. le Dr J.P. BRION , Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique	Examineur
M ^{me} le Dr M. HAMDANE , Maître de conférences, Université de Lille 2, France	Examineur (Co-directeur de Thèse)
M. le Dr L. BUEE , Directeur de Recherches, CNRS, Inserm U837, Lille, France	Examineur

UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2
École Doctorale Biologie-Santé (ED446)

THÈSE

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

Spécialité : neurosciences

Présentée par

Alexis BRETTEVILLE

**Modélisation et étude des mécanismes moléculaires de la
dégénérescence neurofibrillaire : vers la compréhension d'une mort
neuronale liée à la dysfonction des protéines Tau**

Soutenue publiquement le 29 octobre 2007 devant le Jury composé de :

M. le Dr C. BOURAS , Professeur, Université de Genève, Suisse	Rapporteur
M. le Dr A. BUISSON , Professeur, Université de Caen Basse-Normandie, France	Rapporteur
M. le Dr J.P. BRION , Professeur, Université Libre de Bruxelles, Belgique	Examineur
M ^{me} le Dr M. HAMDANE , Maître de conférences, Université de Lille 2, France	Examineur (Co-directeur de Thèse)
M. le Dr L. BUEE , Directeur de Recherches, CNRS, Inserm U837, Lille, France	Examineur

Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications:

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

Hamdane M., Dourlen P., **Bretteville A.**, Sambo A.V., Ferreira S., Ando K., Kerdraon O., Begard S., Geay L., Lippens G. et al. (2006). Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 32, 155-60.

Hamdane M., **Bretteville A.**, Sambo A. V., Schindowski K., Begard S., Delacourte A., Bertrand P. and Buee L. (2005). p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death. *J Cell Sci* 118, 1291-8.

Leroy K., **Bretteville A.**, Schindowski K., Gilissen E., Authelet M., De Decker R., Yilmaz Z., Buée L, Brion ., J.P. Hippocampal atrophy, severe axonopathy and neurofibrillary tangles without neuronal loss in a mutant Tau transgenic mice (**sous presse**). (jointe en [Annexe 3, p.135](#))

Bretteville A., Schindowski K., Bégard S., Loyens A., Delacourte A., Beauvillain J.C., Sergeant N., Hamdane M. And Buee L. Overexpressing Tau mutants in neuroblastoma cells leads to Tau conformational changes associated with the early steps of Tau nucleation. (**Manuscrit en préparation**)

Communications orales :

Generation and characterisation of an *in VIVO* model of Neurofibrillary degeneration : A key tool in understanding neuronal degeneration in Alzheimer's Disease. 6th Journée André VERBERT, Colloque Annuel des Doctorants, September 27 2006, Lille, France.

New Tau transgenic mice without motor deficit. *APOPIS Tau Lille Workshop: Tau proteins and neurodegenerative disorders* April 3-4, 2006 Lille, France.

Comparative analysis of two Tau mutants transgenic mice, based on the same Tau construct but showing different phenotypes. *1st Summer School at University of Göttingen, September. 18-21, 2007. NEURAD Neurodegeneration in Alzheimer's disease*

Communications par affiches :

Bretteville A., Schindowski K., Bégard S., Loyens A., Delacourte A., Beauvillain J.C., Sergeant N., Hamdane M. and Buee L. Overexpressing Tau mutants in neuroblastoma cells leads to Tau conformational changes associated with the early steps of Tau nucleation. *8th International conference AD/PD, march 14-18 2007, Salzburg, Austria.*

Ando K., Dourlen P., Sambo A.V., Bélarbi K., Schindowski K., **Bretteville A.**, Maurage C.A., Drobecq H., Guestem A., Bégard S., Landrieu I., Delacourte A., Hamdane M., Sergeant N., Buée L. Abnormal modification of Pin1 isoforms in Alzheimer's Disease Brains. 10th *Journée Scientifique du réseau LARC-Neurosciences, October 15 2006, Paris, France.*

Buee L., **Bretteville A.**, Ando K., Dourlen P., Kerdraon O., Bégard S., Schindowski K., Maurage C.A., Galas M.C., Hamdane M.. Tau phosphorylation, tauopathies, mitosis-related disease. *10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders's (ICAD), July 15-20 2006, Madrid.*

Leroy K., Authelet M., Schindowski K., **Bretteville A.**, Dedecker R., Zehra Y., Gilissen E., Bégard S., Hamdane M., Boom A., Buee L., Brion J.P.. Alzheimer-type neurofibrillary lesions and neurofilamentous inclusions are cell-type specific in transgenic mice expressing mutated Tau proteins G272V/P301S. *10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders's (ICAD), July 15-20 2006, Madrid.*

Schindowski K., **Bretteville A.**, Leroy K., Bégard S., Brion J.P., Hamdane M., Buee L.. Alzheimer disease-like Tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated Tau transgenic mouse without any motor deficits. *10th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders's (ICAD), July 15-20 2006, Madrid.*

Bretteville A., Hamdane M., Sergeant N., Bégard S., Delacourte A. & Buée L. Impact of mutations and phosphorylation on Tau aggregation: starting point of understanding mechanisms underlying neuronal death in neurodegenerative disorders. 7th *Colloque de la Société des Neurosciences, May 17-20 2005, Lille, France.*

Hamdane M., Dourlen P., **Bretteville A.**, Sambo A. V., Ferreira S., Bégard S., Geay L., Delacourte A., Lippens G., Maurage C. A., Galas M. C. & Buée L. Pin1 as a key regulator of Tau phosphorylation: relevance to neurodegeneration. 7th *Colloque de la Société des Neurosciences, May 17-20 2005, Lille, France.*

Buée L., Hamdane M., **Bretteville A.**, Dourlen P., Ando K., Bégard S., Kerdraon O., Delacourte A., Maurage C. A. & Galas M. C. Alzheimer type neurofibrillary degeneration: an alternate pathway to apoptosis. 7th *Colloque de la Société des Neurosciences, May 17-20 2005, Lille, France.*

Hamdane M., Sambo A.V., Smet C., Dourlen P., **Bretteville A.**, Ferreira S., Bégard S., Geay L., Sergeant N., Galas M.C., Delacourte A., Lippens G. & Buée L. Pin1 allows for a differential Tau phosphorylation : a new pathway to neurofibrillary degeneration. *7th International conference AD/PD, March 9-13 2005, Sorrento, Italy.*

Hamdane M., Sambo A.V., **Bretteville A.** & Buée L. Reactivation of cell cycle events through a p25/cdk5 mediated rb phosphorylation in neuronal cells. *7th International conference AD/PD, March 9-13 2005, Sorrento, Italy.*

Modélisation et étude des mécanismes moléculaires de la dégénérescence Neurofibrillaire : vers la compréhension d'une mort neuronale liée à la dysfonction des protéines Tau

En 1907, Aloïs Alzheimer publiait, pour la première fois, la description des deux lésions histologiques caractéristiques observées dans le cerveau d'une patiente âgée de 56 ans et atteinte d'une démence présénile qui, par la suite, sera dénommée Maladie d'Alzheimer (MA). Ces deux lésions correspondant à l'accumulation de matériel protéique présentent des caractéristiques différentes de par leur contenu protéique et leur localisation. Ainsi, on distinguera, d'une part, les dépôts amyloïdes, caractérisés par l'accumulation, dans le milieu extracellulaire, d'un peptide appelé peptide amyloïde- β . D'autre part, on observera une lésion intra-neuronale appelée dégénérescence neurofibrillaire (DNF) qui correspond à l'accumulation de protéines Tau qui sont retrouvées hyperphosphorylées, anormalement phosphorylées et agrégées sous la forme de structures fibrillaires hélicoïdales singulières appelées PHFs pour « *Paired Helical Filaments* ». Notre laboratoire s'intéresse tout particulièrement à cette lésion qui est au cœur du processus dégénératif de la MA et d'un ensemble de pathologies démentielles appelées « Tauopathies ». Cependant, si la dérégulation de phosphorylation de Tau semble être au cœur du processus dégénératif de ces pathologies, le rôle exact de celle-ci et les mécanismes mis en jeu restent encore mal connus.

Ce travail, se place ainsi dans le cadre général de la recherche des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale liée à Tau et de l'étude de la signification et du rôle de la dérégulation de la phosphorylation de Tau dans son agrégation et au cours de la mort neuronale. Afin de répondre à ces objectifs, nous avons entrepris l'étude de modèles permettant de moduler soit l'état de phosphorylation de Tau par le biais du complexe kinasique p25/Cdk5 soit de moduler le caractère agrégatif de Tau par l'utilisation de mutations pathologiques de Tau connues chez l'homme pour mener à son agrégation et à des syndromes démentiels (Démences Fronto-Temporales avec syndrome Parkinsonien liées au chromosome 17). De plus, notre travail a permis la caractérisation d'un modèle *in vivo* de DNF présentant l'ensemble des caractéristiques de la pathologie Tau observée au cours de la MA. Ce modèle, en raison de l'absence de troubles moteurs, a permis de réaliser des études comportementales, montrant l'existence de troubles de mémoire spatiale chez ces souris. En parallèle à ce modèle pertinent d'un point de vue physiopathologique, le développement et l'analyse d'un modèle cellulaire de type neuronal basé sur la surexpression de protéines Tau mutées ont permis de montrer l'existence de modifications conformationnelles des protéines Tau mutées qui sont associées à un état particulier de phosphorylation. Cependant, dans ce contexte, il apparaît que les mutations, à elles seules ne semblent pas suffisantes pour mener à l'agrégation des protéines Tau sous la forme de PHFs. De plus, l'analyse d'un modèle cellulaire de type neuronal présentant une phosphorylation anormale de Tau ne montre pas non plus l'existence de structures analogues aux PHFs.

L'ensemble de ce travail suggère que la phosphorylation anormale ou les mutations de Tau ne sont pas suffisantes pour mener au phénotype pathologique caractéristique de la DNF qui semble nécessiter d'autres événements moléculaires. Nous émettons également l'hypothèse que des voies compensatoires impliquant des systèmes de déphosphorylation des protéines Tau et/ou des systèmes de dégradation protéique pourraient être mis en jeu dans nos modèles cellulaires et être ainsi responsables de l'absence de phénotype pathologique. La diminution d'activité de ces systèmes de compensation au cours du vieillissement chez l'homme et dans les modèles murins pourrait alors concourir à l'apparition de la DNF. Ainsi, l'étude de ces systèmes dans nos différents modèles constitue des perspectives prometteuses pour l'avancée dans la compréhension de l'étiopathologie de la MA et des Tauopathies.

Mots-clés : Maladie d'Alzheimer, hyperphosphorylation, phosphorylation anormale, mutations DFTP-17, agrégation protéique

Development of experimental models for studying molecular mechanisms involved in Neurofibrillary degeneration

In 1907, Aloïs Alzheimer presented the clinical and neuropathological characteristics of a neurodegenerative disorder that was later named Alzheimer's Disease. This pathology is mainly characterized by two histological lesions called Amyloid deposits and Neurofibrillary Degeneration. On the one hand, Amyloid deposits are localized at the outside of neurons and are constituted of Amyloid- β peptide aggregates. On the other hand, neurodegenerating neurons display aggregates called NFTs for "Neurofibrillary Tangles" which are composed of Paired Helical Filaments of hyperphosphorylated and abnormally phosphorylated Tau proteins. These Tau aggregates are also found in a group of dementia so called "Tauopathies". This kind of observation leads to the hypothesis that NFTs are a central event in the degenerating process. However, even if aggregated Tau is always hyperphosphorylated and abnormally phosphorylated, the question of whether the phosphorylation alone or in combination with additional cofactors is involved in Tau aggregation and neuronal death is not well elucidated yet.

To investigate this relationship, we developed cellular and mice models based on the overexpression of Tau protein bearing pathological mutations which are known to trigger Tau aggregation in several inherited dementia. The analysis of transgenic mice shows an increased Tau pathology with aging. This pathology displays the main features of NFTs observed in AD (Tau Hyperphosphorylation, Tau abnormal phosphorylation and Tau aggregation). Moreover, the lack of motor deficits has allowed us to perform cognitive tests and to discover spatial memory deficits in these transgenic mice. However, overexpression of Tau mutants in neuronal-like cell lines induces some conformational changes associated to a specific Tau phosphorylation pattern without formation of NFTs like aggregates. We also undertook studies of a cellular model, based on the overexpression of p25 which induces a deregulated Cdk5 kinase activity which is associated with abnormal Tau phosphorylation. However, in the same manner, we did not see any Tau aggregation in this cellular model.

Altogether, these data suggest that in our cellular models, neither the abnormal phosphorylation nor pathological mutations alones are able to trigger Tau aggregation. Additional events are likely needed to induce NFTs formation. In this way, we hypothesized that some cellular pathways including Tau dephosphorylation and Tau degradation ways could be involved in our cellular model to avoid Tau aggregation. Hence, a decrease in efficiency of such systems with aging could participate in the NFTs formation process in humans and in transgenic mice models. Studies of these "protective systems" in our models could represent interesting perspective of research for the understanding of AD and Tauopathies physiopathology.

Keywords : Alzheimer's disease, hyperphosphorylation, abnormal phosphorylation, FTDP-17 mutations, protein aggregation

Table des matières

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	5
INTRODUCTION.....	6
1 PHYSIOLOGIE DE LA PROTEINE TAU	6
1.1 DU GENE A LA PROTEINE.....	7
1.2 LA PROTEINE TAU : STRUCTURE ET FONCTIONS	9
1.2.1 <i>Structure</i>	9
1.2.2 <i>Fonctions de la protéine Tau</i>	11
1.2.2.1 Tau : une protéine régulatrice de la dynamique microtubulaire.....	11
1.2.2.1.a Tau et transport axonal	13
1.2.2.1.b Tau et croissance neuritique/développement	14
1.2.2.2 Tau et autres partenaires :	15
1.2.2.2.a Tau et actine.....	15
1.2.2.2.b Tau et complexes péri-membranaires.....	15
1.2.2.2.c Tau et organites cellulaires	16
1.2.3 <i>Modifications post-traductionnelles de Tau et régulation</i>	17
1.2.3.1 Phosphorylation	17
1.2.3.1.a Kinases	17
1.2.3.1.b Phosphatases	19
1.2.3.1.c Phosphorylation et fonctions de Tau	22
1.2.3.2 Autres modifications post-traductionnelles	24
1.2.3.2.a O-glycosylation.....	24
1.2.3.2.b Ubiquitination	25
1.2.3.2.c Sumoylation	25
2 LES TAUOPATHIES : EXEMPLE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	26
2.1 LE CONCEPT DE TAUOPATHIES	27
2.2 LA MALADIE D'ALZHEIMER	29
2.2.1 <i>Généralités</i>	29
2.2.2 <i>Aspects neuropathologiques et histologiques de la maladie d'Alzheimer</i>	31
2.2.2.1 Aspects macroscopiques	31
2.2.2.2 Aspects microscopiques	31
2.2.2.2.a Les dépôts amyloïdes	32
2.2.2.2.b La dégénérescence Neurofibrillaire	33
2.2.2.2.c L'interrelation entre les deux lésions	36
3 MECANISMES MOLECULAIRES DE LA DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE	38

3.1	DEREGULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU.....	38
3.1.1	<i>Hyperphosphorylation</i>	38
3.1.2	<i>Phosphorylation anormale</i>	40
3.1.3	<i>Acteurs de la dérégulation de la phosphorylation de Tau</i>	41
3.1.3.1	La Glycogène Synthase kinase 3-β.....	42
3.1.3.2	La kinase Cdk5	45
3.1.3.2.a	Le complexe physiologique p35/Cdk5.....	45
3.1.3.2.b	Dérégulation de l'activité Cdk5 par l'activateur pathologique p25.....	45
3.1.3.2.c	p25/ Cdk5 un complexe impliqué dans la dégénérescence neuronale de la MA.....	46
3.1.3.3	Autres acteurs	48
3.2	MODELISATION DE LA DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE.....	49
3.2.1	<i>Les modèles DFTP-17</i>	49
3.2.1.1	Les modèles murins DFTP-17.....	50
3.2.1.2	Les modèles cellulaires DFTP-17.....	53
3.2.2	<i>Les modèles Tau sauvages</i>	56
3.2.2.1	Les modèles de surexpression	56
3.2.2.2	Les modèles d'hyperphosphorylation de Tau sauvage.....	57
	RESULTATS	60
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	60
1	DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATION D'UN MODELE MURIN DE DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE	61
1.1	OBJECTIFS	61
1.2	RESULTATS	62
1.3	CONCLUSIONS	63
1.3.1	<i>Conception du Modèle Thy-Tau22</i>	63
1.3.2	<i>Analyse spatiale et temporelle de l'expression de la pathologie Tau dans les souris Thy-Tau22</i>	63
1.3.3	<i>Conséquences fonctionnelles de la pathologie Tau</i>	65
2	MODIFICATIONS ANORMALES DE TAU ET MODELES CELLULAIRES	68
2.1	MODELE DE NEUROBLASTOME EXPRIMANT DES TAU MUTEES DFTP-17	68
2.1.1	<i>Objectifs</i>	68
2.1.2	<i>Résultats</i>	69
2.1.3	<i>Conclusions</i>	70
2.1.3.1	Conception du modèle	70
2.1.3.2	Mutations de Tau et Réseau microtubulaire	70
2.1.3.3	Mutations de Tau et caractéristiques pathologiques	71
2.1.3.3.a	Phosphorylation	71
2.1.3.3.b	Agrégation.....	72

2.2	MODELE DE PHOSPHORYLATION ANORMALE.....	73
2.2.1	<i>Objectifs</i>	73
2.2.2	<i>Résultats</i>	74
2.2.3	<i>Conclusions</i>	75
2.3	BILAN MODELES CELLULAIRES.....	77
2.4	PIN1 : UNE ISOMERASE PERMETTANT LA DEPHOSPHORYLATION DIFFERENTIELLE DE TAU.....	78
2.4.1	<i>Objectifs</i>	78
2.4.2	<i>Résultats</i>	79
2.4.3	<i>Conclusions</i>	80
2.4.3.1	Pin1 augmente au cours de la différenciation neuronale.....	80
2.4.3.2	Pin1 entraîne une déphosphorylation de Tau spécifiquement à la Thr231.....	80
	DISCUSSION	82
1	MECANISMES A L'ORIGINE DE L'AGREGATION DE TAU : ROLE DE LA PHOSPHORYLATION ?.....	82
2	QUEL EST LE ROLE DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU DANS LA MORT NEURONALE ET QUELLES SONT LES FORMES PATHOLOGIQUES DE TAU IMPLIQUEES ?	87
3	DEFAILLANCE DE SYSTEMES DE COMPENSATION/REPARATION DES PROTEINES TAU PATHOLOGIQUES : LE LIEN AVEC LE VIEILLISSEMENT ?	92
	CONCLUSIONS	96
	BIBLIOGRAPHIE	97
	ANNEXES	131

Liste des figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE, DU GENE, DES ARNm(S) ET DES DIFFERENTES ISOFORMES DE TAU ADAPTEE DE (SERGEANT <i>ET AL.</i> , 2005):	8
FIGURE 2: SEQUENCE PRIMAIRE ET STRUCTURE DE LA PROTEINE TAU.	10
FIGURE 3 : INTERACTION TAU ET MICROTUBULES ET TRANSPORT MICROTUBULAIRE.	12
FIGURE 4 :PIN1 FACILITE LA DEPHOSPHORYLATION DE TAU <i>IN VITRO</i> PAR LA PROTEINE PP2A :.....	21
FIGURE 5 : SCHEMATISATION DE LA REGULATION DE LA DYNAMIQUE MICROTUBULAIRE PAR LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET CONSEQUENCES BIOLOGIQUES :.....	22
FIGURE 6 : « LE CODE BARRE » DES TAUOPATHIES :.....	27
FIGURE 7 : ASPECTS MACROSCOPIQUES ET LESIONS MICROSCOPIQUES DES CERVEAUX DE PATIENTS ATTEINTS DE LA MA :.....	30
FIGURE 8 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE AMYLOÏDOGENIQUE CONDUISANT A LA FORMATION DU PEPTIDE AMYLOÏDE- β A PARTIR DE SON PRECURSEUR APP :	31
FIGURE 9 : ASPECTS MICROSCOPIQUES DES DEPOTS AMYLOÏDES ET TECHNIQUES DE MARQUAGE :	32
FIGURE 10 : ASPECTS MICROSCOPIQUES DE LA DEGENERESCENCEUROFIBRILLAIRE ET TECHNIQUES DE MARQUAGE :	33
FIGURE 11 : LES TROIS STADES D'EVOLUTION CYTOLOGIQUE DE LA DEGENERESCENCEUROFIBRILLAIRE, AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ET ADAPTES D'APRES (AUGUSTINACK <i>ET AL.</i> , 2002).	34
FIGURE 12 : PROGRESSION DE LA DEGENERESCENCEUROFIBRILLAIRE AU COURS DE LA MALADIE D'ALZHEIMER :.....	35
FIGURE 13 : ILLUSTRATION DE LA CASCADE D'EVENTEMENTS RELIANT LA PATHOLOGIE AMYLOÏDE A LA DEGENERESCENCEUROFIBRILLAIRE SELON (HARDY AND SELKOE, 2002).....	36
FIGURE 14 : DEREGULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE TAU ET SONDAS IMMUNOLOGIQUES :.....	39
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES DE REGULATION DE LA GSK3- β IMPLIQUEES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER.	44
FIGURE 16 : DEREGULATION DE L'ACTIVITE DE CDK5 PAR DELOCALISATION SUBCELLULAIRE ET AUGMENTATION DE SON ACTIVITE EN REPONSE A UN STRESS CELLULAIRE :.....	47
FIGURE 17 : LA PATHOLOGIE TAU DANS UN MODELE MURIN DE DEGENERESCENCEUROFIBRILLAIRE BASE SUR LA SUREXPRESSION D'UNE PROTEINE TAU MUTEE P301L (LEWIS <i>ET AL.</i> , 2000):.....	51
FIGURE 18 : CARACTERISTIQUES PRINCIPALES DE LA PATHOLOGIE TAU OBSERVEE DANS LA LIGNEE DE SOURIS TRANSGENIQUES THY-TAU22 :	64
FIGURE 19 : MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA MORT NEURONALE SUITE A LA SUREXPRESSION DE P25 :.....	76
FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE HYPOTHESE DE MECANISME D'ACTION DE LA PHOSPHORYLATION SUR LA FORMATION DE « FOYERS DE NUCLEATION » ADAPTEE DE (ALONSO ADEL <i>ET AL.</i> , 2004)	86
FIGURE 21 : SCHEMA DE SYNTHESE DES HYPOTHESES RELATIVES A LA DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE : UNE MORT NEURONALE LIEE A LA DYSFONCTION DES PROTEINES TAU.	91
FIGURE 22: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'AUTOPHAGIE MEDIEE PAR LES CHAPERONES. (MAJESKI AND DICE, 2004)	94
FIGURE 23 : SYSTEMES DE COMPENSATION/REPARATION CAPABLES DE PRENDRE EN CHARGE LES PROTEINES TAU ANORMALES :.....	95

Liste des Tableaux

TABLEAU 1 : REPARTITION DES SITES DE PHOSPHORYLATION EN FONCTION DES ISOFORMES DE TAU.....	17
TABLEAU 2: PROTEINES KINASES IMPLIQUEES DANS LA PHOSPHORYLATION DE TAU, IDENTIFIEES PAR DES ETUDES <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> ET SITES DE PHOSPHORYLATION :	18
TABLEAU 3: PRINCIPALES PHOSPHATASES ET LEUR EFFICACITE RELATIVE EN FONCTION DES SITES DE PHOSPHORYLATION DE TAU.....	20
TABLEAU 4 : LES MODELES MURINS DE DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE ET LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DE LA DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE OBSERVEES DANS CES MODELES :	53

Introduction

Introduction

En 1907, Aloïs Alzheimer publiait, pour la première fois, la description des deux lésions histologiques caractéristiques observées dans le cerveau d'une patiente âgée de 56 ans et atteinte d'une démence présénile qui, par la suite, sera dénommée Maladie d'Alzheimer (MA). Ces lésions nommées dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire (DNF) correspondent à l'accumulation de protéines particulières dont l'identité a été découverte dans les années 80. Ainsi, on sait que les dépôts amyloïdes correspondent à l'accumulation extracellulaire d'un peptide appelé peptide amyloïde- β (Glennner and Wong, 1984a; Glennner and Wong, 1984b) qui dérive d'une protéine précurseur appelée APP. La DNF, quant à elle, correspond à l'agrégation intra-neuronale d'une protéine associée aux microtubules dénommée Tau (Brion, 1985) et dont l'état de phosphorylation est dérégulé (Flament and Delacourte, 1989; Flament *et al.*, 1989). Notre laboratoire, depuis une vingtaine d'année, s'intéresse à cette lésion qui se place au cœur du processus dégénératif. En effet, la DNF est également retrouvée dans des syndromes démentiels apparentés à la MA et regroupés sous le terme de « Tauopathies ».

A l'heure actuelle, les mécanismes impliqués dans la mort neuronale observée dans la MA et les Tauopathies sont mal connus. L'objectif de ce travail de thèse a donc été de développer des modèles expérimentaux pour l'étude des événements moléculaires impliqués dans la cascade délétère de la DNF.

Avant de présenter les résultats de ce travail, une première partie introductive sera consacrée à l'état actuel des connaissances sur la biologie et la régulation physiologique de Tau. La deuxième partie de cette introduction sera dédiée à la dérégulation pathologique de Tau observée dans les Tauopathies et en particulier dans la MA. Enfin, la dernière partie de cette introduction présentera les principaux modèles expérimentaux actuels permettant l'étude des mécanismes de la DNF.

1 Physiologie de la protéine Tau

La protéine Tau pour « *tubulin associated unit* » est décrite pour la première fois en 1975 (Cleveland *et al.*, 1977a; Cleveland *et al.*, 1977b; Weingarten *et al.*, 1975) comme un facteur essentiel à la stabilisation microtubulaire. Depuis, on sait que cette protéine cytosolique appartient à la famille des MAPs pour « *microtubule associated protein* ». Elle intervient

majoritairement dans la régulation de la dynamique des microtubules, essentielle à de nombreuses fonctions au sein du neurone, telles que le transport axonal.

1.1 Du gène à la protéine

Le gène humain de Tau est localisé sur le chromosome 17 en position 17q21 (Andreadis *et al.*, 1995; Neve *et al.*, 1986) et s'étend sur plus de 140 Kb. Ce gène mosaïque après transcription conduit à la formation d'un pré ARNm contenant 16 exons numérotés de -1 à 14 ([Figure 1, p.8](#)) qui subit un épissage alternatif (Andreadis *et al.*, 1992). Ainsi les exons 4A et 8, chez l'homme, sont systématiquement exclus au niveau du système nerveux central (SNC) et parmi ces deux exons, seul l'exon 4A est retrouvé au niveau du système nerveux périphérique (SNP) (Georgieff *et al.*, 1993). L'inclusion de cet exon donne une isoforme de Tau de plus grande taille nommée « Big Tau », peu étudiée mais qui pourrait, dans les neurones du SNP, augmenter l'espacement des microtubules et le diamètre des axones (Andreadis *et al.*, 1996; Boyne *et al.*, 1995; Georgieff *et al.*, 1993). L'exon 6 quant à lui a été récemment retrouvé de façon très minoritaire dans les ARN messagers de Tau au niveau du cerveau et du cervelet humain (Luo *et al.*, 2004). En outre, il contient deux sites d'épissages différents pouvant conduire soit à l'expression de formes plus longues de Tau, contenant l'exon 6 soit à l'expression de formes tronquées de Tau (6p et 6d [Figure 1, p.8](#)) par décalage du cadre de lecture et lecture de codons stop prématurés (Andreadis *et al.*, 1993). Les exons -1 et 14 sont des exons transcrits mais non traduits (région 5' et 3' UTR).

Enfin, trois séquences codant respectivement pour les exons 2, 3 et 10 sont alternativement épissées et conduisent, au niveau du SNC, à l'expression de 6 isoformes majeures de Tau de 352 AA à 441 AA ($2^-3^-10^-$; $2^-3^-10^+$; $2^+3^-10^-$; $2^+3^-10^+$; $2^+3^+10^-$; $2^+3^+10^+$); l'exon 3 étant inclus uniquement en présence de l'exon 2 au niveau du cerveau humain (Andreadis *et al.*, 1992) ([Figure 1, p.8](#)).

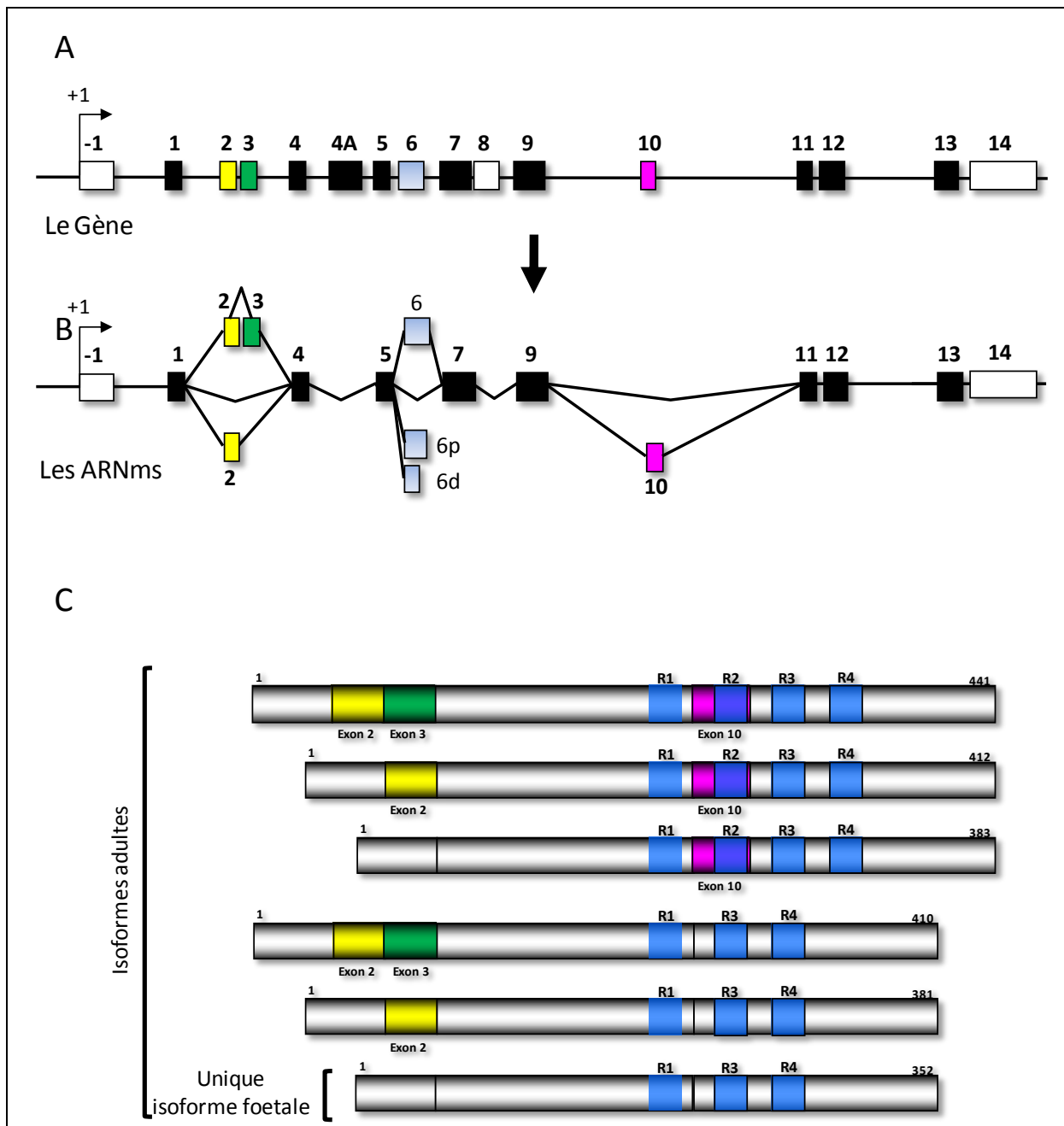


Figure 1 : Représentation schématique, du gène, des ARNm(s) et des différentes isoformes de Tau adaptée de (Sergeant *et al.*, 2005):

(A) Le gène de Tau contient 16 exons, numérotés de -1 à 14. L'exon 8 est systématiquement épissé chez l'homme alors que l'exon 4A n'est présent que dans une isoforme de Tau particulière (BigTau) retrouvée uniquement au niveau du SNC. (B) Représentation schématique des ARNs messagers de Tau après épissage constitutif des exons 4A et 8 au niveau du SNC. Les exons -1 et 14 sont transcrits mais non traduits. L'épissage alternatif des exons 2,3 et 10 mènera à l'expression de 6 isoformes majeures au niveau du SNC. (C) Représentation des six isoformes majeures de la protéine Tau issues des différents épissages alternatifs. L'épissage alternatif de l'exon 10 conduit à l'incorporation de 3 à 4 motifs répétés (R1 à R4 : en bleu sur la figure) suivant les isoformes.

Plusieurs études ont montré que l'expression des isoformes de Tau est régulée de façon tissu spécifique et au cours du développement, suggérant ainsi l'importance de cet équilibre d'isoformes pour un type cellulaire donné. Cette hypothèse a été également appuyée par la découverte de mutations introniques de Tau qui perturbent cet équilibre et entraînent une dégénérescence neuronale dans certaines démences familiales (pour revue (Andreadis, 2005).

1.2 La protéine Tau : Structure et fonctions

La protéine Tau comporte une structure dipolaire tant au niveau structural que fonctionnel. En effet, on distingue un domaine amino-terminal acide appelé « domaine de projection » et un domaine carboxy-terminal basique appelé « domaine de liaison aux microtubules ». ([Figure 2, p.10](#))

1.2.1 Structure

Le domaine de projection de Tau correspond à sa partie amino-terminale. Ce domaine de taille variable selon l'inclusion ou non des exons 2 (29 AA) et 3 (29 AA), est composé d'un domaine acide (pHi = 3,8), constitué des exons 1 à 4. Ce dernier est suivi d'un domaine plus basique (pHi = 11,4) riche en résidus proline. L'ensemble de ce domaine a été dénommé « domaine de projection » puisqu'il constituerait l'extrémité libre de Tau à la surface des microtubules (Hirokawa *et al.*, 1988) et lui permettrait d'interagir avec 1) d'autres constituants du cytosquelette et 2) des organites intracellulaires et des complexes protéiques péri-membranaires

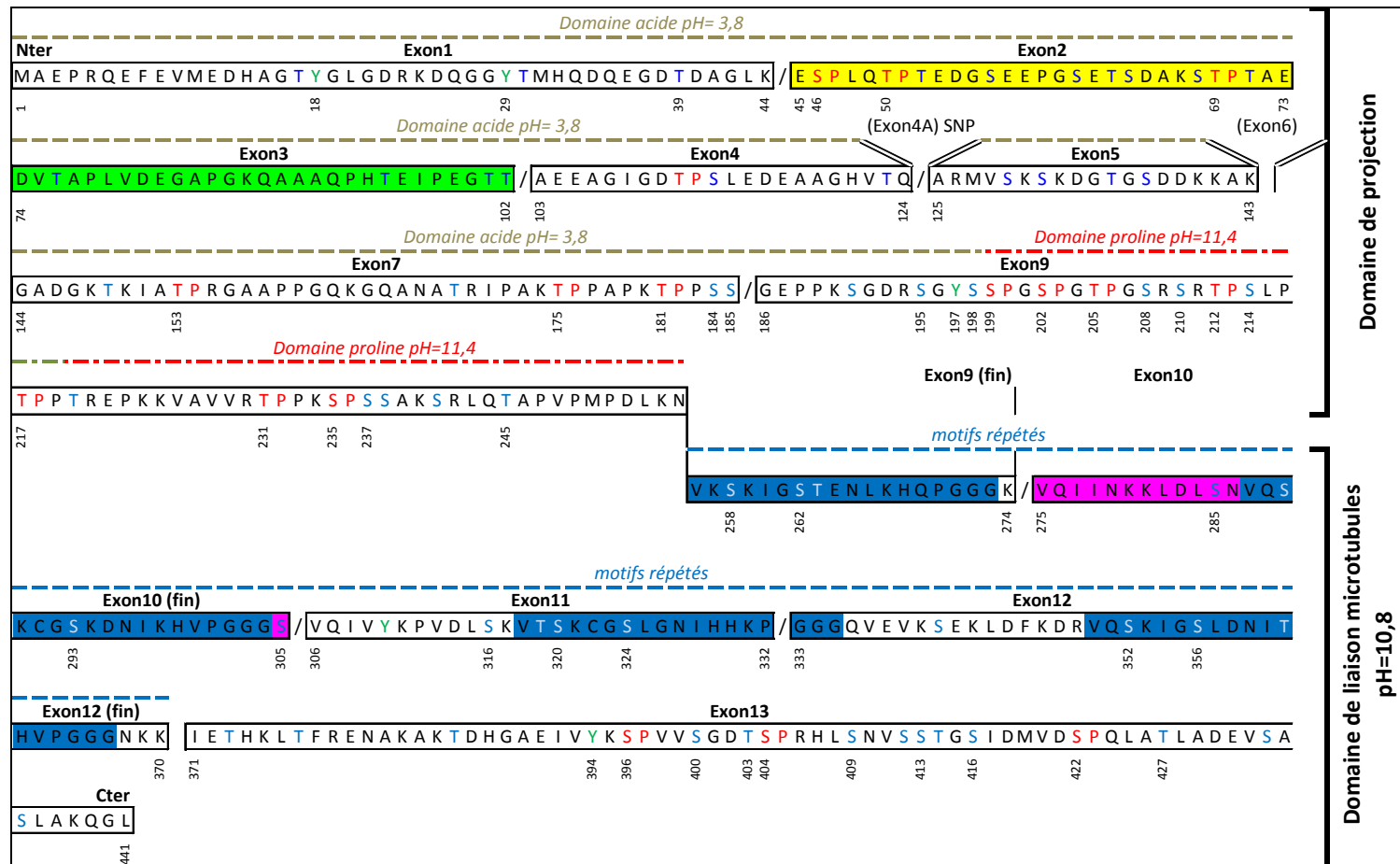


Figure 2: Séquence primaire et structure de la protéine Tau.

La protéine Tau est un dipôle structural divisé en deux domaines. Le domaine N-terminal appelé « domaine de projection » comporte un domaine acide et un domaine riche en proline pouvant interagir avec des protéines à domaine SH3. Le domaine C-terminal appelé « Domaine de liaison aux microtubules » comporte des motifs répétés (rectangles en bleu) capables de lier les microtubules. Les exons sont représentés par les séquences encadrées en noir et les différents types de sites de phosphorylation sont identifiés par une couleur. Les sites Tyrosine (Y) en vert, les sites Ser/Thr-Pro (S/T-P) en rouge et les sites Ser ou Thr en bleu. Les chiffres indiquent la position des AA sur l'isoforme de Tau la plus longue (Tau441 : 2⁺,3⁺,10⁺). SNP (exon inclus au niveau du système nerveux périphérique) Adaptée de (Chen *et al.*, 2004).

Contrairement au « domaine de projection », le domaine carboxy-terminal de Tau présente un pHi beaucoup plus basique (pHi = 10,8). Sa taille est également variable, puisque lui aussi est soumis à l'épissage alternatif de l'exon 10 qui code pour une séquence de 31 AA (acides aminés 275 à 305). Ce domaine, appelé « domaine de liaison aux microtubules », présente dans sa séquence 3 (R1, R3, R4) à 4 motifs répétés (R1, R2, R3, R4) de 18 AA chacun et qui correspondent à des séquences hautement conservées (Goedert *et al.*, 1989; Himmler *et al.*, 1989) capables de lier les microtubules. Ces motifs sont encodés par les exons 9 à 12 et l'inclusion de l'exon 10 dans les isoformes Tau 4R permet d'apporter un élément de liaison supplémentaire (R2) par rapport aux isoformes 3R sans exon 10 ([Figure 1, p.8](#); [Figure 2, p.10](#)).

1.2.2 Fonctions de la protéine Tau

Initialement décrite comme une protéine associée aux microtubules (Cleveland *et al.*, 1977b), la fonction principale de Tau est de réguler la dynamique microtubulaire par sa capacité à lier et stabiliser les microtubules. Cette fonction place ainsi Tau comme un acteur important dans des fonctions indispensables pour le neurone telles que le transport axonal et la mise en place de la polarité neuronale. Cependant la découverte d'interactions entre Tau et d'autres partenaires suggèrent que Tau pourrait avoir également d'autres fonctions qui sont actuellement mal connues

1.2.2.1 *Tau : une protéine régulatrice de la dynamique microtubulaire*

Les microtubules sont des structures cylindriques d'un diamètre constant de 25 nm déterminé par l'assemblage de 13 protofilaments ; ces protofilaments sont eux-mêmes constitués d'hétérodimères de tubuline α et β . Les microtubules sont également connus pour être des structures en « instabilité dynamique » caractérisées par une élongation et un raccourcissement perpétuels. Cette « instabilité dynamique » est rendue possible grâce à l'ajout de nouveaux dimères à une des extrémités du microtubule : l'extrémité (+) et à la dissociation de dimères à l'autre extrémité : l'extrémité (-). La liaison de protéines MAPs à ces microtubules permettra de rigidifier et donc de stabiliser ces derniers.

L'interaction de Tau avec les microtubules a été le sujet de nombreux travaux. Elle est réalisée grâce à la présence dans son domaine Carboxy-terminal, de motifs spécifiques capables de lier la tubuline. (Figure 3A, p.12). De plus, l'existence de 3 à 4 domaines de liaisons, suivant les isoformes, conféreront aux isoformes 4R une capacité plus importante à lier, polymériser et stabiliser les microtubules *in vitro* (Butner and Kirschner, 1991; Goedert and Jakes, 1990; Panda *et al.*, 2003) et *in cellulo* (Bunker *et al.*, 2004). L'augmentation de cette capacité de liaison est apportée par l'ajout d'un domaine de liaison aux microtubules supplémentaire (R2) et d'une région « *Inter Repeat* » (IR) reliant les domaines de répétition R1 et R2 (IR R1R2 : $_{265}\text{KVQIINKK}_{272}^1$) (Goode and Feinstein, 1994) (Figure 3A (encart), p.12).

En effet, cette région « *Inter Repeat* » est capable de lier les microtubules sur des sites différents de ceux occupés par les domaines de répétition et d'induire à elle seule une polymérisation des microtubules *in vitro* (Goode and Feinstein, 1994).

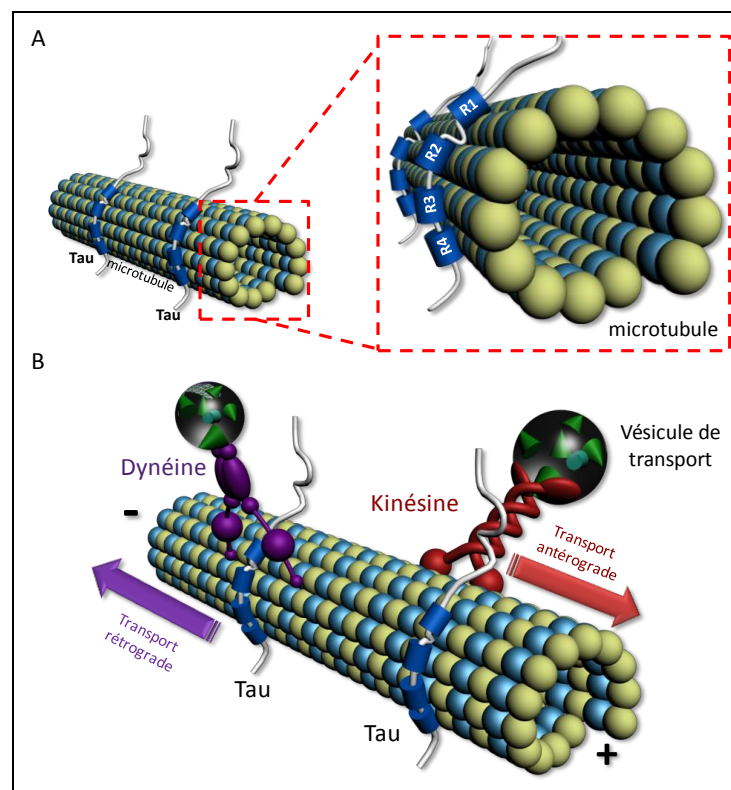


Figure 3 : Interaction Tau et microtubules et transport microtubulaire.

(A) La protéine Tau est une MAP capable de lier les microtubules au moyen de domaines de répétition au nombre de 3 ou 4 suivant les isoformes (R1 à R4 représentés sur une isoforme 4R). L'ajout d'un 4^{ème} domaine de répétition et d'une région *Inter-repeat* R1-R2 confèrera une capacité plus importante des isoformes 4R à lier et stabiliser les microtubules (Goode and Feinstein, 1994). (B) Les microtubules sont de véritables « rails moléculaires » sur lesquels des MAPs motrices telles que la Kinésine et la dynéine pourront assurer le transport antérograde et rétrograde de vésicules de transport ou d'organites cellulaires.

On peut également noter qu'une partie du domaine riche en proline de Tau ($_{224}\text{KKVAVVR}_{230}$ ¹) semble changer la structure locale de Tau par une liaison intramoléculaire de ce domaine avec le premier domaine de répétition. En réalisant cette interaction, ce domaine riche en proline augmente la liaison de Tau aux microtubules (Goode *et al.*, 1997).

Enfin il semble que Tau puisse également agir sur la stabilisation des microtubules de façon indirecte en protégeant ces derniers de l'action d'enzymes telles que la Katanine, dont la fonction est de couper les microtubules (Qiang *et al.*, 2006).

1.2.2.1.a Tau et transport axonal

Le neurone est une cellule polarisée présentant un pôle somato-dendritique composé du corps cellulaire et des dendrites et un pôle fonctionnel composé de l'axone et de la synapse. (pôle axono-synaptique). La synapse étant située à distance du corps cellulaire, un transport axonal bidirectionnel assurant l'acheminement et le retour de nombreux éléments (neurotransmetteurs, mitochondries...) va être nécessaire pour le fonctionnement physiologique du neurone. Ainsi, les microtubules, structures dynamiques se comportant comme de véritables « tapis roulants », serviront de support à des MAPs motrices comme la Dynéine et la Kinésine qui, parmi d'autres MAPs, assureront respectivement les transports antérograde (vers la synapse) et rétrograde (vers le corps cellulaire) d'organites et autres vésicules cellulaires ([Figure 3B, p.12](#)).

De par sa fonction stabilisatrice, Tau va pouvoir assurer le maintien de ces « rails microtubulaires ». Cependant, un équilibre régulé entre les différentes MAPs stabilisatrices (Tau, MAP1b, MAP2...) et motrices présentes à la surface des microtubules, semble nécessaire à un transport axonal normal. Ainsi, il a été montré que la surexpression d'une protéine Tau exogène *in cellulo* affectait négativement le transport antérograde par compétition de liaison avec la Kinésine (Ebner *et al.*, 1998; Seitz *et al.*, 2002; Stamer *et al.*, 2002). Ces résultats ont été étayés par des données obtenues dans des modèles *in vivo*, où la surexpression de différentes isoformes de Tau chez des souris transgéniques est connue pour entraîner des troubles du transport axonal (Spittaels *et al.*, 1999) (Ishihara *et al.*, 1999) (Probst *et al.*, 2000 ; Terwel *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004). De la même façon, le remplacement du gène de la protéine Tau par l'ADNc codant pour une seule isoforme de Tau (4R) dans un modèle murin entraîne également une dysfonction de ce transport (Terwel *et al.*, 2005).

¹ Numérotation basée sur l'isoforme la plus longue de Tau

En résumé, il semble qu'un équilibre finement régulé en protéines Tau soit nécessaire au bon fonctionnement de ce transport axonal. Toute perturbation touchant soit le niveau d'expression de Tau ou le ratio d'isoformes (mutations introniques de Tau [cf.§3.2.1, p.49](#)) provoquera une altération du transport axonal et pourrait être délétère pour le neurone.

1.2.2.1.b Tau et croissance neuritique/développement

L'établissement de la polarisation et en particulier la mise en place de l'axone constitue une étape fondamentale à la maturation du système nerveux. Cette mise en place de l'axone, étant dépendante, en partie, de la dynamique microtubulaire, plusieurs études se sont intéressées au rôle de Tau dans un tel processus. Ainsi, la surexpression de Tau, dans des cellules de phéochromocytome de Rat (PC12) différenciées en cellules de type neuronal par traitement au *Nerve Growth Factor* (NGF), induit l'apparition de processus neuritiques (Drubin *et al.*, 1985). Ces résultats ont été également vérifiés dans un modèle de culture primaire de neurones de cervelet (Esmaeli-Azad *et al.*, 1994). A l'inverse, la diminution de l'expression de Tau dans ces mêmes cultures cellulaires, par une approche d'ARN anti-sens, entraîne une diminution des prolongements neuritiques (Caceres and Kosik, 1990).

Ces résultats ont pu être également confirmés dans des modèles de cultures primaires de neurones issues de souris transgéniques invalidées pour Tau qui présentent également une diminution de croissance neuritique (Dawson *et al.*, 2001).

Cependant, une étude récente basée sur l'invalidation de Tau dans des cultures primaires de neurones hippocampiques (siRNA), n'a pas montré de diminution de processus neuritiques et nuance ainsi les conclusions des résultats précédents (Qiang *et al.*, 2006). Cette différence pourrait être expliquée par le fait que d'autres MAPs comme les protéines MAP2 ou MAP1b pourraient également participer à cette croissance neuritique. En effet, un modèle murin invalidé (*Knock Out*) doublement pour les gènes *map1b* et *tau* montre l'existence d'une importante dysgénésie des prolongements axonaux et une malformation des couches neuronales hippocampiques et constitue un phénotype beaucoup plus sévère que le simple *Knock Out* Tau (Takei *et al.*, 2000). Néanmoins, si d'autres MAPs interviennent dans la mise en place de la polarité de la cellule neuronale et dans la maturation du système nerveux, il semble que Tau soit un acteur important dans ce processus.

1.2.2.2 Tau et autres partenaires :

A côté du rôle principal de Tau dans la régulation de la dynamique microtubulaire, un certain nombre d'études ont montré que Tau pouvait interagir avec d'autres partenaires comme l'actine ou d'autres éléments cellulaires.

1.2.2.2.a Tau et actine

Au sein des neurones, l'actine est retrouvée dans les microfilaments d'actine qui assurent essentiellement des fonctions de maintien et de plasticité du cytosquelette neuronal. Cependant, ces microfilaments peuvent également jouer un rôle dans le transport de vésicules à courtes distances.

Plusieurs études ont pu montrer que le domaine carboxy-terminal de Tau était impliqué dans des interactions avec le cytosquelette d'actine *in vitro* (Correas *et al.*, 1990; Moraga *et al.*, 1993; Selden and Pollard, 1986; Yamauchi and Purich, 1993) et probablement *in cellulo* (Roger *et al.*, 2004; Yu and Rasenick, 2006). On pourra également noter que cette liaison de l'actine agit comme un compétiteur de la liaison des microtubules avec Tau puisque les mêmes sites de liaison de Tau sont impliqués (Correas *et al.*, 1990).

Ainsi, cette interaction avec l'actine élargit potentiellement le rôle de Tau dans le maintien et la plasticité du cytosquelette neuronal au-delà de la seule régulation de la dynamique microtubulaire. Enfin, l'importance de cette inter-relation est suggérée par deux récentes études qui montrent que la neurodégénérescence induite par la protéine Tau dans des modèles *in vivo* chez *D.melanogaster* pourrait passer par une déstabilisation du cytosquelette d'actine, essentiel au maintien de la polarité neuronal et de la synapse (Blard *et al.*, 2007; Fulga *et al.*, 2007) (et pour revue (Gallo, 2007)).

1.2.2.2.b Tau et complexes péri-membranaires

Tau est également retrouvée associée à la membrane plasmique (Brandt *et al.*, 1995; Ekinci and Shea, 2000) au sein de complexes protéiques péri-membranaires. La présence de Tau au sein de ces complexes est rendue possible grâce à la liaison de son domaine riche en prolines avec les domaines SH3 de protéines péri-membranaires telles que les kinases de la famille Src (Src, Fyn, Lck) (Lee *et al.*, 1998). Ces complexes protéiques, localisés entre

autres, dans des micro-domaines membranaires appelés « Rafts lipidiques » semblent jouer un rôle dans des processus biologiques fondamentaux pour le neurone comme la mise en place du cône de croissance (Klein *et al.*, 2002) (pour revue (Lee, 2005). Enfin, il a récemment été montré que Tau pouvait agir sur le cytosquelette d'actine via une voie de signalisation Src dépendante (Sharma *et al.*, 2007). D'autre part, Tau est également connue pour interagir avec la PLC- γ membranaire *in vitro* (Hwang *et al.*, 1996) et *in vivo* (Jenkins and Johnson, 1998).

1.2.2.2.c Tau et organites cellulaires

A ce jour, il a été montré *in vitro* que Tau et d'autres MAPs comme la protéine MAP2 sont capables d'interagir avec les mitochondries (Jancsik *et al.*, 1989; Jung *et al.*, 1993) et que le domaine de liaison aux microtubules est impliqué dans cette interaction (Jancsik *et al.*, 1989). Enfin, Tau a été également retrouvée, après séparation, dans des fractions membranaires spécifiques de l'appareil de Golgi (Farah *et al.*, 2006). Cependant, la signification biologique de ces interactions est encore, à ce jour, mal connue.

En résumé, si un certain nombre d'études suggèrent l'existence de nouvelles fonctions pour Tau comme modulateur potentiel du cytosquelette d'actine et de différentes voies de signalisation cellulaire (pour revues (Buee et al., 2000; Sergeant et al., 2005), il apparaît que la fonction principale de Tau et la plus étudiée reste encore la régulation de la dynamique microtubulaire via sa capacité à lier et à stabiliser les microtubules grâce à son domaine carboxy-terminal.

Cette capacité de liaison, régulée par un équilibre d'isoformes 3R et 4R aux pouvoirs de liaison différents ainsi que par des modifications post-traductionnelles de Tau (cf. §1.2.3.1.c, p.22), apparaît primordiale au bon fonctionnement du réseau microtubulaire et aux fonctions qui en découlent (croissance axonale et transport axonal). Ainsi, un quelconque déséquilibre en protéines Tau (isoformes ou quantité) ou de ses modifications post-traductionnelles semble être néfaste au fonctionnement du neurone et pourrait affecter le transport axonal.

1.2.3 Modifications post-traductionnelles de Tau et régulation

1.2.3.1 Phosphorylation

La phosphorylation constitue la modification post-traductionnelle majeure de Tau. En effet, la protéine Tau comporte, entre 67 et 85 sites potentiellement phosphorylables, suivant l'isoforme considérée, ce qui représente environ 20% des AA et définit Tau comme un « accepteur universel de groupements phosphate » (Stoothoff and Johnson, 2005). Parmi ces sites, on distingue des sites Ser/Thr suivis d'une Proline (entre 14 et 17), des sites Sérines et Thréonine seules et 5 tyrosines ([Tableau 1 p.17](#)).

isoforme	exons à épissage alternatif	Nb de sérines	dont Ser/Pro	Nb de thréonines	dont Thr/Pro	Nb de Tyrosines	Total sites potentiellement phosphorylables
Tau 352	2'3'10'	36	dont 6	26	dont 8	5	67
Tau 383	2'3'10 ⁺	40	dont 6	26	dont 8	5	71
Tau 381	2 ⁺ 3'10'	41	dont 7	31	dont 10	5	77
Tau 412	2 ⁺ 3'10 ⁺	45	dont 7	31	dont 10	5	81
Tau 410	2 ⁺ 3 ⁺ 10'	41	dont 7	35	dont 10	5	81
Tau 441	2 ⁺ 3 ⁺ 10 ⁺	45	dont 7	35	dont 10	5	85

Tableau 1 : Répartition des sites de phosphorylation en fonction des isoformes de Tau

L'état de phosphorylation de Tau fait l'objet d'une régulation étroite qui fait intervenir des kinases, des phosphatases ainsi que d'autres modulateurs tels que les isomérases.

1.2.3.1.a Kinases

A ce jour, 15 à 20 protéines kinases ont été identifiées, par des études *in vitro* et/ou *in vivo*, comme des régulateurs de la phosphorylation de Tau ([Tableau 2 p.18](#)). Ces kinases ont été regroupées en fonction du type d'épitope phosphorylé. Ainsi, dans le groupe des PDPK, pour « *proline directed protein kinases* », qui phosphorylent les sites de type Ser/Thr-Pro, on trouve des « *cyclin dependent kinases* » (Cdk2, Cdk5), des MAPs pour « *mitogen activated protein kinases* » et des kinases de stress telles que les SAPK pour « *stress activated protein kinases* » (ERK, p38,...).

A côté, les kinases comme la CamKII pour « *calcium/calmodulin-dependent kinase II* », les « *Casein Kinase I et II* » (CK I, CK II), les kinases de la famille MARK pour « *microtubule associated/affinity regulating kinases* », les PKA et les PKB prendront en charge la phosphorylation des sites Ser et Thr non Ser/Thr-Pro.

A noter, que les GSK-3 α et β pour « *Glycogen Synthase Kinase 3 α et β* » sont capables de phosphoryler aussi bien des sites de type « Ser/Thr-Pro » que des sites de type non « Ser/Thr-Pro ».

Enfin on peut noter l'existence d'un petit groupe de kinases responsables de la phosphorylation des Tyrosines de Tau. Dans ce groupe, on retrouve des kinases de la famille Src telles que Fyn (Derkinderen *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2004) et Lck (Williamson *et al.*, 2002) ainsi que la kinase *abelson* (c-abl) qui serait responsable de la phosphorylation de Tau à la Tyr394 (Derkinderen *et al.*, 2005).

1.2.3.1.b Phosphatases

Un très grand nombre d'études se sont intéressées à l'identification des phosphatases impliquées dans la régulation de l'état de phosphorylation de Tau. Ainsi, les phosphatases PP1, PP2A, PP2B (calcineurin) et la phosphatase PP5 (Gong *et al.*, 2004) sont impliquées dans la déphosphorylation *in vitro* de Tau. Tout comme les kinases, ces phosphatases présentent une certaine spécificité d'action puisque l'inhibition pharmacologique spécifique de PP2A et PP2B, dans des cultures primaires de neurones issues de fœtus de rat, entraîne une augmentation de la phosphorylation à des sites distincts (pour revues (Buee *et al.*, 2000; Sergeant *et al.*, 2005).

Ces données ont été renforcées par des études *in vitro* de la contribution relative des phosphatases PP1, PP2A, PP2B et PP5 à la déphosphorylation spécifique de plusieurs sites de phosphorylation de Tau (Liu *et al.*, 2005a) ([Tableau 3, p.20](#))

Enfin, il est à noter que PP2A est la phosphatase majoritaire dans le cerveau (Goedert *et al.*, 1995) où elle présente une activité beaucoup plus importante que les autres phosphatases (Liu *et al.*, 2005a). Ces données suggèrent ainsi que PP2A serait la phosphatase majoritairement impliquée dans la déphosphorylation de Tau au niveau du cerveau humain (pour revue (Avila *et al.*, 2004).

Sites de phosphorylation	Efficacité relative des PPases
Ser199	PP5 > PP2A > PP1 ≈ PP2B
Ser202	PP5 > PP2A > PP2B > PP1
Thr205	PP1 ≈ PP2A ≈ PP5 > PP2B
Thr212	PP5 > PP1 ≈ PP2A > PP2B
Ser214	PP1 > PP2A ≈ PP5 > PP2B
Ser262	PP2A ≈ PP2B > PP1 > PP5
Ser396	PP2B > PP5 > PP1 ≈ PP2A
Ser404	PP2B > PP5 > PP1 > PP2A
Ser409	PP1 > PP2B > PP2A ≈ PP5

Tableau 3: Principales phosphatases et leur efficacité relative en fonction des sites de phosphorylation de Tau

Adaptée de (Liu *et al.*, 2005a).

En résumé, il existe un grand nombre de kinases et plusieurs phosphatases qui assurent une balance de phosphorylation/déphosphorylation afin de maintenir une homéostasie de phosphorylation de Tau qui constitue le régulateur de ses principales fonctions cellulaires (cf. §1.2.3.1.c, p.22)

Cependant, la régulation de la phosphorylation de Tau apparaît encore plus complexe que cette simple vision d'une balance kinases/phosphatases. En effet, plusieurs études ont suggéré que la phosphorylation de Tau pouvait apparaître de façon séquentielle. Ainsi, il semble, à titre d'exemples, que la phosphorylation à la Ser235 peut être un pré-requis à la phosphorylation de Tau à la Thr231 (Cho and Johnson, 2004; Li *et al.*, 2006a; Sengupta *et al.*, 2006). Cet exemple de phosphorylation séquentielle ou « *priming* » pourrait faire intervenir la kinase Cdk5 puis la kinase GSK-3 β (Li *et al.*, 2006a; Sengupta *et al.*, 2006). Ce mécanisme a été également suggéré pour d'autres sites tels que les épitopes : Ser404, Ser400 et Ser396, où la phosphorylation à la Ser396 et à la Ser400 par la GSK-3 β semble nécessiter une pré-phosphorylation de la Ser404 par la Cdk5 (Li *et al.*, 2006a; Li and Paudel, 2006). De plus, cette coopération entre kinases a été également observée entre GSK-3 β et PKA pour les Ser212 et Ser214 (Zheng-Fischhofer *et al.*, 1998), PKA et SAPK4/JNK2 pour les Ser212, Ser214 et Ser217 (Yoshida and Goedert, 2006), DYRK et GSK-3 β (Woods *et al.*, 2001) pour les Ser212 et Ser208, GSK-3 β et Cdk5 pour un grand nombre de sites (Liu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007a) et les kinases CamKII et Cdk5 (Wang *et al.*, 2007a). Il faut également noter que si l'action séquentielle de deux kinases permet l'apparition de certains épitopes, l'action inverse peut empêcher, quant à elle, l'apparition de ces épitopes (Yoshida and Goedert, 2006; Zheng-Fischhofer *et al.*, 1998).

De plus, une grande partie des kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau peuvent agir de façon indirecte par le biais de l'activation d'autres kinases ; ce type de coopération a été montré *in vivo* pour la Cdk5 et la GSK-3 β (Plattner *et al.*, 2006) et (pour revue (Johnson and Stoothoff, 2004). Ce type d'interaction semble exister également entre phosphatases et kinases puisque la PP2A pourrait conduire à l'inhibition des kinases ERK et JNK (Kins *et al.*, 2003) ou CamKII (Benneicib *et al.*, 2001) et que la phosphatase PP1 pourrait également réguler l'activité des kinases GSK-3 β , Cdk5 et Cdc2 (Benneicib *et al.*, 2000).

Enfin, une autre classe enzymatique appelée isomérase semble intervenir également dans la régulation de l'état de phosphorylation de Tau. En effet, la protéine Pin1, une enzyme catalysant l'isomérisation Cis/Trans des sites Ser/Thr-Pro comme la Thr231, facilite l'action de la Trans-phosphatase PP2A *in vitro* (Zhou *et al.*, 2000) ([Figure 4, p.21](#)).

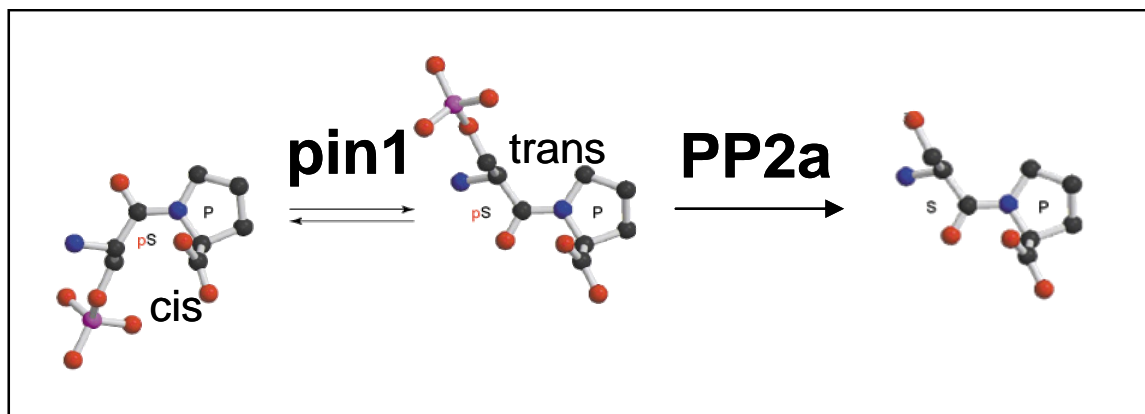


Figure 4 :Pin1 facilite la déphosphorylation de Tau *in vitro* par la protéine PP2A :

Pin1 catalyse l'isomérisation Cis/trans de la liaison pSer/pThr-Pro rendant Tau plus accessible à la Trans phosphatase PP2A.

*En conclusion, la régulation de l'état de phosphorylation de Tau apparaît comme un processus extrêmement complexe faisant intervenir un très grand nombre de candidats ainsi que des mécanismes différents. De plus, il a été également suggéré que d'autres modifications post-traductionnelles telles que la O-glycosylation pouvaient agir en tant que compétiteur direct de la phosphorylation sur certains sites (Lefebvre *et al.*, 2003; Zachara and Hart, 2002), complexifiant encore plus cette régulation.*

Au final, il apparaît, à ce jour, que nous n'avons que des visions parcellaires de la régulation de la phosphorylation de Tau et que ce processus de régulation dans sa globalité reste encore mal compris.

1.2.3.1.c Phosphorylation et fonctions de Tau

La phosphorylation qui représente la modification post-traductionnelle majeure de Tau va être impliquée de façon majoritaire dans la régulation de ses fonctions et principalement dans sa liaison aux microtubules.

- Phosphorylation de Tau et liaison aux microtubules (Figure 5, p.22)

Une étude *princeps* menée *in vitro* par Lindwall et collaborateurs en 1984, basée sur la déphosphorylation des protéines Tau a pu montrer que les protéines Tau déphosphorylées présentaient une meilleure efficacité à polymériser les microtubules que les formes phosphorylées (Lindwall and Cole, 1984a).

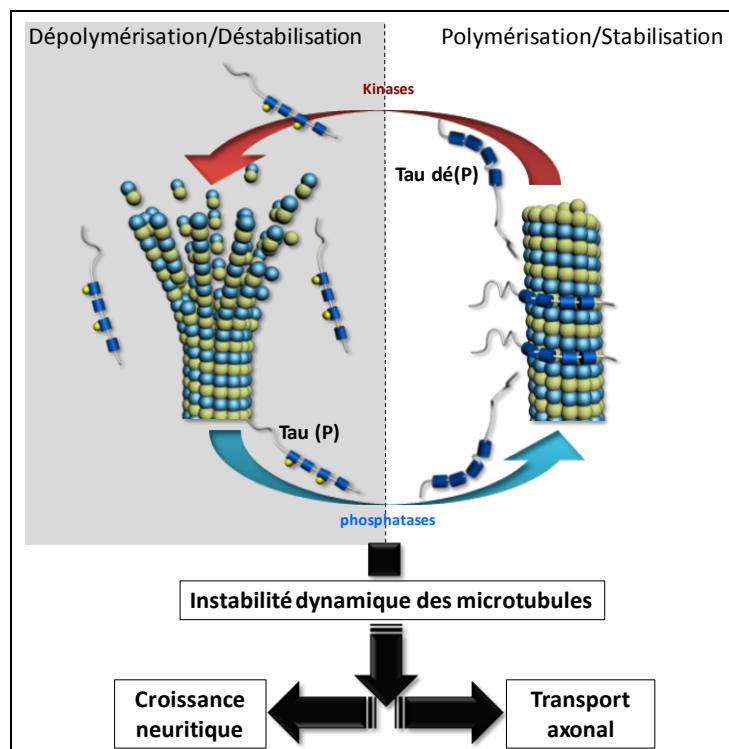


Figure 5 : Schématisation de la régulation de la dynamique microtubulaire par la phosphorylation de Tau et conséquences biologiques :

Les formes phosphorylées de Tau présentent une capacité moins importante à lier et stabiliser les microtubules. Un équilibre de kinases et phosphatases permettant de contrôler l'état de phosphorylation des protéines Tau pourra réguler cette balance stabilisation/déstabilisation importante pour maintenir une « instabilité dynamique des microtubules » nécessaire à des processus biologiques fondamentaux du neurone tels que la croissance axonale et le transport axonal. La phosphorylation de Tau à deux sites impliqués de façon majeure (Ser262 et Ser356), est schématiquement représentée par une sphère jaune au niveau des motifs répétés R1 et R3.

Par la suite, et avec l'arrivée des outils immunologiques, plusieurs travaux se sont intéressés à étudier l'effet de la phosphorylation de différents sites sur la liaison de Tau aux

microtubules et sa capacité à polymériser ces derniers. Ainsi, la phosphorylation aux Ser262 et Ser356 (sites KXGS), localisées dans les domaines de répétition, diminue fortement la liaison de Tau aux microtubules *in vitro* (Biernat *et al.*, 1993; Drewes *et al.*, 1995). *In cellulo*, cette phosphorylation aura des répercussions fonctionnelles sur les mécanismes cellulaires dépendants des microtubules. En effet, il a été montré que la phosphorylation aux sites Ser262 et Ser356 est nécessaire à la croissance normale des prolongements cellulaires, dans des cellules d'insecte Sf9, (Biernat and Mandelkow, 1999). Parmi les kinases de Tau capables de phosphoryler ces sites, il apparaît que les kinases MARK et PKA semblent être impliquées dans la régulation de ces fonctions (Biernat and Mandelkow, 1999; Biernat *et al.*, 2002).

Cependant, la phosphorylation au Ser262 et Ser356 ne semble pas abolir totalement la liaison de Tau aux microtubules (Seubert *et al.*, 1995) et suggère, au moins en partie, l'implication d'autres sites de phosphorylation dans cette interaction. Depuis, il a été montré que la phosphorylation de Tau à la Thr231 était également impliquée dans la régulation de la liaison de Tau aux microtubules *in vitro* (Sengupta *et al.*, 1998) et *in cellulo* (Cho and Johnson, 2003; Cho and Johnson, 2004; Hamdane *et al.*, 2003b).

De la même façon, il a été montré *in cellulo*, qu'il existait un état décroissant de la phosphorylation de Tau aux Ser199/202 du soma vers les axones en cours de croissance (Mandell and Banker, 1996) suggérant un rôle de la phosphorylation dans la croissance axonale.

Enfin, de façon plus générale, il apparaît que le niveau de phosphorylation de Tau est plus important pendant le développement embryonnaire que dans les stades post-natal et adulte (Brion *et al.*, 1993). Cet état de phosphorylation, associé à une expression embryonnaire spécifique des isoformes 3R (Goedert and Jakes, 1990), à faible pouvoir de liaison, pourrait ainsi concourir à « l'instabilité dynamique » des microtubules, nécessaire à la plasticité neuritique lors de la maturation du système nerveux embryonnaire.

Par ailleurs, la phosphorylation de Tau va également pouvoir moduler le transport axonal. En effet, comme décrit précédemment ([cf. §1.2.2.1.a, p.13](#)), la saturation des microtubules due à la surexpression de Tau *in cellulo* (Ebner *et al.*, 1998; Seitz *et al.*, 2002; Stamer *et al.*, 2002) et *in vivo* bloque le transport axonal. En revanche, la co-expression d'une kinase telle que la GSK-3 β avec Tau rétablit en partie ce transport dans un modèle murin (Spittaels *et al.*, 2000) et chez la drosophile (Mudher *et al.*, 2004). De la même façon, Tatebayashi et

collaborateurs ont pu également montrer que la phosphorylation de Tau par la GSK-3 β était requise pour le transport antérograde d'organelles cellulaires dans des cellules PC12 (Tatebayashi *et al.*, 2004). On peut noter que d'autres kinases comme MARK semblent également être impliquées dans la régulation de ce transport axonal (Mandelkow *et al.*, 2004).

- *Phosphorylation de Tau et autres fonctions potentielles*

Comme décrit précédemment ([cf. §1.2.2.2.c p.16](#)), Tau interagit avec d'autres éléments et organites cellulaires. Dans ce cadre, même si les conséquences fonctionnelles de telles interactions restent encore à déterminer, il apparaît que la phosphorylation régule ces interactions. En effet, deux études ont pu montrer que la phosphorylation des Ser202/Thr205, Thr231 (Maas *et al.*, 2000) et Ser396/Ser404 (Ekinci and Shea, 2000; Maas *et al.*, 2000) n'était pas retrouvée dans la fraction de Tau liée à la membrane plasmique. De plus l'hyperphosphorylation de Tau, par traitement à l'acide okadaïque (un inhibiteur de phosphatases) ou par transfection de mutants de Tau mimant une hyperphosphorylation (remplacement des sites Ser/Thr par des Glu), semble diminuer de façon importante, *in cellulo*, la liaison de Tau à la membrane plasmique (Maas *et al.*, 2000).

1.2.3.2 Autres modifications post-traductionnelles

1.2.3.2.a O-glycosylation

La O-glycosylation correspond à l'ajout de résidus glucidiques N-acétyl-glucosamine sur des résidus Sérine ou Thréonine. Cette modification post-traductionnelle de Tau, dont la signification biologique reste encore assez floue, pourrait jouer un rôle dans des mécanismes cellulaires tels que la régulation de facteurs de transcription ou la localisation subcellulaire des protéines. Cette modification étant retrouvée sur les neurofilaments et les MAPs comme MAP2 et Tau, elle pourrait également intervenir dans la régulation de l'organisation du cytosquelette (Arnold *et al.*, 1996) (pour revue (Hart *et al.*, 1996)). De plus, puisque les sites impliqués dans cette modification post-traductionnelle sont les mêmes que pour la phosphorylation, il est admis que cette modification agirait sur Tau de façon antagoniste à la phosphorylation ; les deux modifications étant exclusives l'une de l'autre (Lefebvre *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006b; Zachara and Hart, 2002). La O-glycosylation semble également jouer un rôle sur la localisation subcellulaire de Tau puisque les formes O-glycosylées sont retrouvées majoritairement dans le noyau (Lefebvre *et al.*, 2003).

1.2.3.2.b Ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle consistant en la liaison covalente, sur des résidus Lysines d'une protéine cible, d'une (mono-ubiquitination) ou de plusieurs unités (poly-ubiquitination) d'une protéine ubiquitaire de 76 AA appelée ubiquitine. Cette modification met en jeu plusieurs protéines telles que les « ubiquitin activating enzyme », les « ubiquitin conjugating enzyme » et, de façon plus importante, différentes ubiquitine ligases qui permettront, en fonction de l'ubiquitine ligase considérée, d'assurer la liaison de l'ubiquitine à des substrats spécifiques. Ce type de modification permet l'adressage de la protéine substrat à un complexe multi-protéique de dégradation des protéines appelé protéasome et participe ainsi à la régulation de la demi-vie des protéines.

L'observation, dans la MA, d'une poly-ubiquitination de Tau (Mori *et al.*, 1987; Morishima-Kawashima *et al.*, 1993) aux lysines 254, 311 et 353 (Cripps *et al.*, 2006), a été à la base des études qui se sont intéressées à l'implication du système ubiquitine-protéasome dans la dégradation de Tau. En effet, il a été montré *in cellulo* (Hatakeyama *et al.*, 2004; Petrucelli *et al.*, 2004; Shimura *et al.*, 2004b) et *in vivo* (Dickey *et al.*, 2006b), que certaines ubiquitine-ligases comme la protéine CHIP étaient impliquées dans l'ubiquitination de Tau. Ces données suggèrent que Tau pourrait être prise en charge par une voie de dégradation protéasome dépendante. Cependant, les données de la littérature à ce sujet semblent assez contradictoires. A ce jour, si la prise en charge de Tau par le protéasome est démontrée *in vitro* (David *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005), les données *in cellulo* semblent moins évidentes. En effet, certaines études montrent une diminution de la dégradation de Tau (ou son accumulation) suite à l'inhibition pharmacologique du protéasome (inhibiteurs spécifiques comme MG132 et Lactacystine) (David *et al.*, 2002; Goldbaum *et al.*, 2003) alors que d'autres, plus récentes montrent *a contrario* que le protéasome ne serait pas impliqué (Brown *et al.*, 2005) (Delobel *et al.*, 2005; Feuillette *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que la mutation invalidante de la sous-unité 20S $\beta 6$ du protéasome, dans un modèle *in vivo* établi chez *D.melanogaster*, ne provoque pas d'accumulation de la protéine Tau exogène mais plutôt une diminution de sa quantité (Feuillette *et al.*, 2005).

1.2.3.2.c Sumoylation

La sumoylation consiste en la liaison, sur un résidu Lysine d'une protéine appelée « *small ubiquitin-like modifier* » (SUMO), en raison de son analogie structurale avec

l'ubiquitine. Le rôle de cette modification découverte récemment reste encore assez vague mais elle pourrait, suivant les substrats, être impliquée dans des mécanismes de réparation de l'ADN, la régulation du cycle cellulaire et le « *trafficking* » des protéines entre le noyau et le cytoplasme. De façon intéressante, la sumoylation pourrait également diminuer la dégradation ubiquitine dépendante des protéines en agissant comme un antagoniste de l'ubiquitination (pour revue (Dohmen, 2004). Récemment, la protéine Tau a été décrite comme pouvant être sumoylée sur la Lysine 340 de Tau. Dans cette étude, les auteurs suggèrent que la sumoylation de Tau pourrait s'opposer à l'ubiquitination, ces deux modifications étant exclusives l'une de l'autre (mêmes sites impliqués) (Dorval and Fraser, 2006). Néanmoins le rôle et les conséquences de cette modification restent encore à déterminer.

En conclusion, Tau fait l'objet de plusieurs modifications post-traductionnelles qui auront des conséquences multiples sur les fonctions de Tau. La phosphorylation est sa principale modification physiologique et régule un grand nombre de ses interactions. Enfin, de façon importante, il faut noter que la phosphorylation reste la modification post-traductionnelle de Tau la plus étudiée puisque sa dérégulation semble être associée à la physiopathologie de nombreuses maladies neurodégénératives appelées : Tauopathies.

2 Les Tauopathies : exemple de la maladie d'Alzheimer

La plupart des maladies neurodégénératives se caractérisent par une perte de populations neuronales spécifiques, en partie responsable de la diversité des signes cliniques observés dans ces pathologies. La quasi-totalité de ces maladies, d'un point de vue moléculaire, se caractérisent par des agrégats protéiques au niveau neuronal et/ou glial et l'identification histologique et biochimique du constituant majeur de ces agrégats, a permis la classification de ces maladies neurodégénératives. Parmi ces dernières, on retrouve les synucléinopathies (maladie de Parkinson, démences à corps de Lewy), les maladies à prion (maladie de Creutzfeldt Jacob), les maladies à expansion de poly-glutamine (ataxies spino-cérébelleuses, chorée de Huntington) et les Tauopathies.

2.1 Le concept de Tauopathies

Un certain nombre de démences neurodégénératives se caractérisant par des agrégats intracellulaires de protéines Tau anormalement phosphorylées, ont été regroupées sous le terme de Tauopathies.

D'un point de vue histopathologique, ces agrégats peuvent prendre des aspects histologiques différents suivant les pathologies. Ainsi, on distinguera : **La dégénérescenceneurofibrillaire (DNF)** observée dans la maladie d'Alzheimer, les corps de Pick de la maladie de Pick, ou bien encore les touffes gliales observées dans la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et les plaques astrocytaires de la démence corticobasale (DCB).

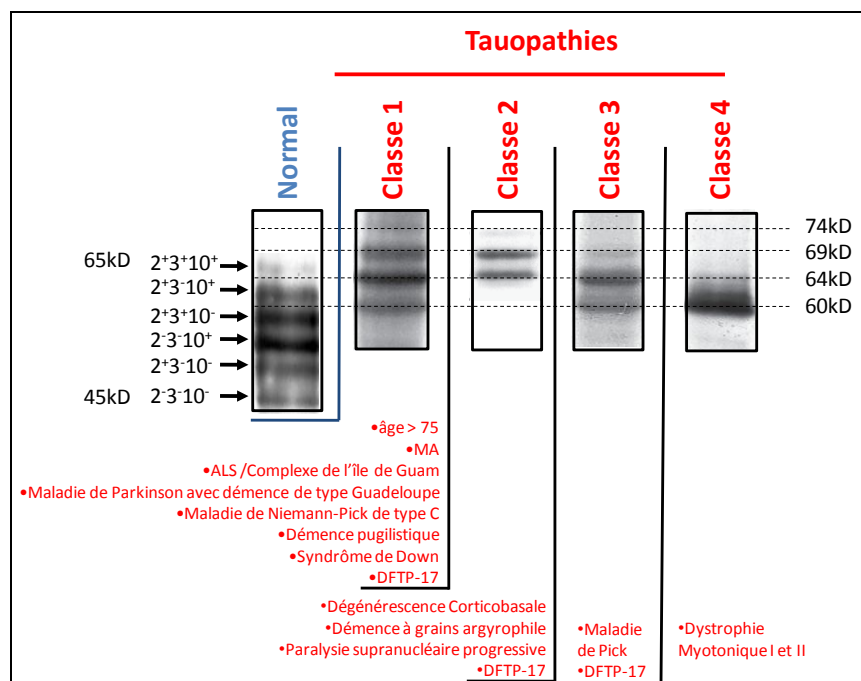


Figure 6 : « Le code barre » des Tauopathies :

Profils électrophorétiques caractéristiques des protéines Tau pathologiques issues d'homogénats de cerveaux humains obtenues après analyse monodimensionnelle et immunoempreinte de Tau. Le profil normal présente les 6 isoformes de Tau d'un poids moléculaire compris entre 45 et 65kDa. ALS : Amyotrophic lateral sclerosis. D'après (Sergeant *et al.*, 2005).

D'un point de vue biochimique, ces Tauopathies, peuvent être également subdivisées en 5 classes distinctes en raison de l'implication de différentes isoformes de Tau dans la formation des agrégats. Cette classification, rendue possible grâce à la caractérisation du profil électrophorétique en SDS-PAGE des protéines Tau agrégées et anormalement phosphorylées, détermine le « code barre » des Tauopathies ([Figure 6, p.27](#)). Ainsi, par comparaison à un

profil normal présentant les 6 isoformes de Tau, on distingue 4 types de Tauopathies (Sergeant *et al.*, 2005):

Le type I : Cette classe de Tauopathies se caractérise par un profil électrophorétique présentant un triplet de protéines Tau à 60, 64 et 69kDa et un variant très mineur à 74 kDa. Ce regroupement des 6 isoformes de Tau sous la forme d'un triplet est du à la modification de la masse moléculaire apparente des isoformes de Tau provoquée par la dérégulation de leur état de phosphorylation (cf. §3.1, p.38). Ainsi, la bande à 60 kDa correspond à l'isoforme de Tau la plus courte ($2^3 10^-$), celle de 64 kDa aux isoformes $2^3 10^+$ et $2^+ 3^- 10^-$ et la bande à 69kDa regroupe les isoformes $2^+ 3^- 10^+$ et $2^+ 3^+ 10^-$. La bande mineure à 74kDa, quant à elle, correspond à l'isoforme de Tau la plus longue $2^+ 3^+ 10^+$. Dans cette classe de Tauopathies, on retrouve la Maladie d'Alzheimer ainsi qu'un certain nombres de maladies neurodégénératives comme les démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (DFTP-17) où l'on retrouve des mutations pathologiques du gène de Tau (cf. §3.2.1, p.49).

Le type II : On retrouve dans ce groupe un profil électrophorétique, caractérisé par un doublet supérieur composé de protéines Tau de masse moléculaire égales à 64 et 69kDa. Ce profil est le résultat d'une phosphorylation anormale des isoformes de Tau à 4 motifs répétés (4R). Cette classe regroupe ainsi des pathologies telles que la paralysie supranucléaire progressive ou la démence corticobasale, où le rapport d'isoformes 4R *versus* 3R est augmenté.

Le type III : Cette classe de Tauopathies est composée des pathologies présentant un profil électrophorétique caractérisé par un doublet inférieur de protéines Tau. Ce doublet à 60kDa et 64kDa, à l'inverse du doublet décrit précédemment, est composé majoritairement des isoformes à 3 motifs répétés (3R) anormalement phosphorylées ; la maladie de Pick fait partie de cette classe.

Le type IV : Cette classe est définie par une seule bande à 60kD composée uniquement de l'isoforme fœtale ($2^3 10^-$) et caractérise une atteinte neurologique nommée dystrophie myotonique de type I ou maladie de Steinert. Cette pathologie est une maladie multi-systémique majoritairement caractérisée par une atteinte musculaire et des troubles cognitifs.

(Le type 0) : Dans cette classe, on retrouvait des pathologies dénommées FTLD pour «*frontotemporal lobar degeneration*» initialement décrites par une absence d'expression de Tau et qui, de ce fait, avaient été classées, parmi les Tauopathies. Cependant, la découverte récente de marqueurs histopathologiques distinctifs tels que des inclusions ubiquitine positives mettant en jeu la protéine TDP-43 pour «*TAR DNA-binding protein-43*» tend à modifier la classification de ces pathologies, avec l'apparition de la dénomination FTLD-u pour «*frontotemporal lobar degeneration-ubiquitine positive* (pour revue (Kumar-Singh and Van Broeckhoven, 2007)). De plus, l'identification récente de mutations dans les gènes des VCP pour «*valosin-containing protein gene*», CHMP2B pour «*charged multivesicular body protein 2B*» et PRGN pour «*progranulin*» (*locus* commun avec Tau en 17q21) exclut, désormais, ces FTLD du concept de Tauopathies.

En résumé, les Tauopathies se caractérisent par une agrégation de protéines Tau qui revêtira un aspect histologique et une signature biochimique différente en fonction des isoformes de Tau mises en jeu. Parmi ces Tauopathies, nous nous intéresserons, plus particulièrement, à la maladie d'Alzheimer qui représente la Tauopathie la plus fréquente.

2.2 La Maladie d'Alzheimer

En 1906, le neuropsychiatre allemand Aloïs Alzheimer présentait, lors de la 37^{ème} réunion de la société des Neuropsychiatres du Sud de l'Allemagne à Tübingen, le cas d'une patiente, Auguste D., victime d'une perte progressive de la mémoire et d'hallucinations. Il y a tout juste cent ans, avec le décès d'Auguste D. à l'âge de 56 ans, Aloïs Alzheimer publiait, la première description histologique *post-mortem* des lésions caractéristiques ([Figure 7B, p.30](#)) observées dans le cerveau de cette patiente atteinte d'une démence présénile qui portera désormais le nom de son découvreur (Alzheimer *et al.*, 1995) (traduction anglaise de l'article original de 1907).

2.2.1 Généralités

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurologique se caractérisant par une atteinte progressive des fonctions mnésiques, cognitives et se traduit par des troubles comportementaux ayant un retentissement sur la vie sociale des patients et de leur entourage. Actuellement, cette maladie touche environ 860 000 patients en France et tend à atteindre 165 000 nouveaux cas par an. En outre, elle représente environ 75% des démences et se pose

ainsi en problème de santé publique majeur et est déclarée en France « grande cause nationale » en 2007¹. De plus, l'absence de marqueurs biologiques périphériques fiables rend difficile le diagnostic *ante-mortem* de cette maladie qui, de ce fait, ne peut être confirmé que par l'analyse neuropathologique et histologique *post-mortem* des cerveaux des patients.

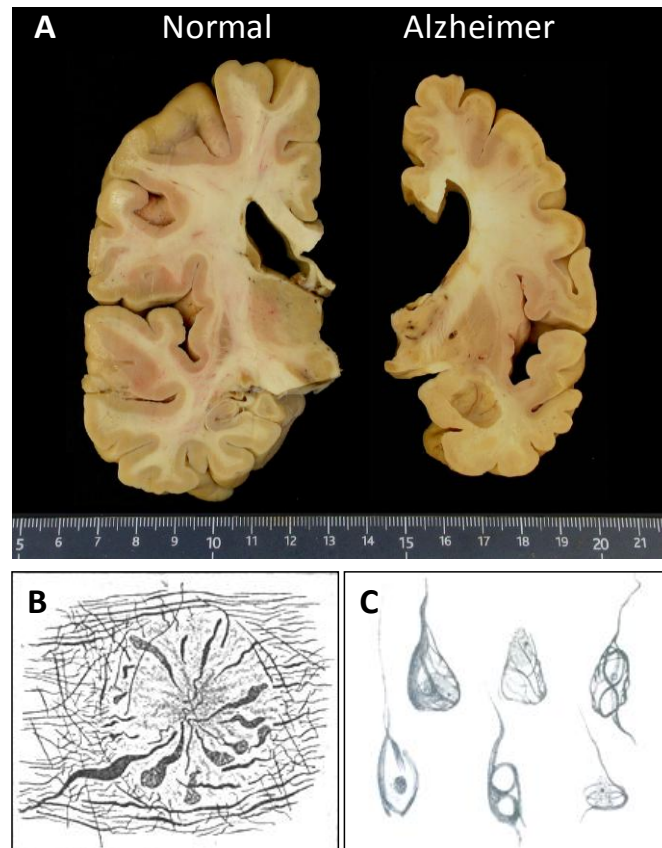


Figure 7 : Aspects macroscopiques et lésions microscopiques des cerveaux de patients atteints de la MA :

A) Comparaison de deux coupes coronales d'un cerveau normal (à gauche) et d'un cerveau de patient atteint de la MA (à droite) à échelle identique (Service d'Anatomie pathologique du CHRU de Lille : Pr C.A. Maurage)
(B-C) Dessins originaux des lésions histologiques caractéristiques de la Maladie d'Alzheimer. B) les dépôts amyloïdes (Oscar Fisher 1907) et C) de la dégénérescence neurofibrillaire (Aloïs Alzheimer 1907).

¹ <http://www.sante.gouv.fr>

2.2.2 Aspects neuropathologiques et histologiques de la maladie d'Alzheimer

2.2.2.1 Aspects macroscopiques

Au niveau macroscopique, les cerveaux des patients atteints présentent une réduction importante du tissu cérébral et une augmentation du volume des sillons corticaux et ventricules cérébraux ([Figure 7A, p.30](#)). Cette atrophie cérébrale à prédominance fronto-temporale est le résultat d'une perte neuronale importante entraînant une réduction du ruban cortical et, par la même, des circonvolutions cérébrales.

2.2.2.2 Aspects microscopiques

Dès 1907, Aloïs Alzheimer décrivait, au moyen de techniques d'imprégnation argentique ([Figure 7\(B-C\), p.30](#)), la présence de deux lésions histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer que sont : 1) les dépôts amyloïdes et 2) la dégénérescence neurofibrillaire.

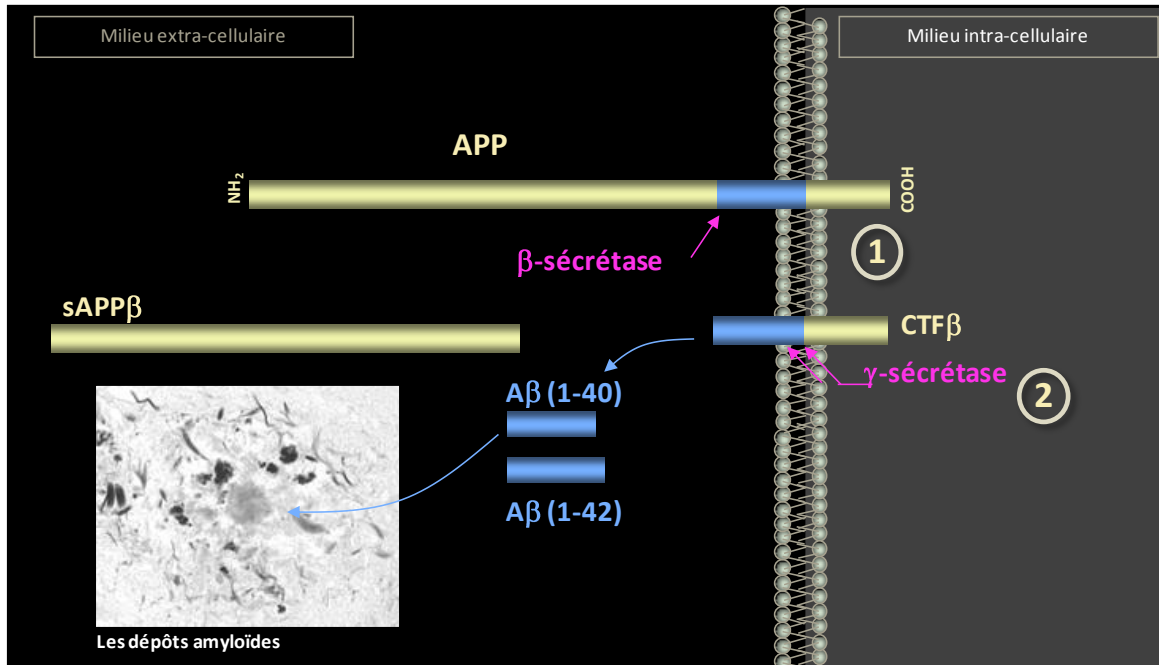


Figure 8 : Représentation schématique de la voie amyloïdogénique conduisant à la formation du peptide amyloïde-β à partir de son précurseur APP :

La formation du peptide amyloïde-β nécessite l'intervention de deux protéases appelées sécrétases. (1) La première enzyme appelée β-sécrétase permet la formation d'un dérivé amino-terminal appelé sAPPβ et d'un produit Carboxy-terminal appelé CTFβ. (2) C'est le clivage de ce produit Carboxy-terminal par la γ-sécrétase à

deux sites différents qui conduira à la formation d'un peptide amyloïde- β (1-40) et d'un peptide amyloïde- β (1-42).

2.2.2.2.a Les dépôts amyloïdes

Les dépôts amyloïdes sont des agrégats protéiques extracellulaires organisés en feuillets β -plissés et constitués d'une petite protéine de 4 kDa appelée peptide amyloïde- β (A β) (Glennner and Wong, 1984a; Glennner and Wong, 1984b). Ce peptide amyloïde est issu d'un précurseur physiologique appelé APP pour « *amyloid precursor protein* », après clivages successifs de ce dernier par deux activités protéolytiques différentes : la β -sécrétase et la γ -sécrétase (pour revue (Suh and Checler, 2002)). Il peut exister sous deux formes majoritaires comportant 40 (A β 40) ou 42 AA (A β 42) en raison de l'existence de deux sites de clivage pour la γ -sécrétase (Figure 8, p.31).

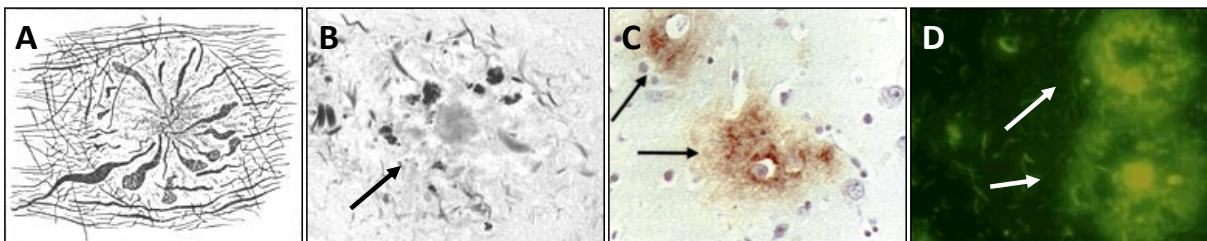


Figure 9 : Aspects microscopiques des dépôts amyloïdes et techniques de marquage :

(A) Dessins originaux d'Oscar Fisher (1907). (B) Imprégnation argentique de la lésion par coloration au Gallyas. (C) Marquage immunohistochimique des lésions au moyen d'anticorps dirigés contre le peptide amyloïde- β (Pr CA Maurage CHRU Lille). (D) Marquage des lésions par la Thioflavine S, un intercalant des feuillets β -plissés.

Au cours de la MA, les peptides A β semblent être impliqués de façon chronologique, puisque les formes A β 42 sont retrouvées de façon précoce dans les dépôts sous leur forme immature (dépôts diffus) alors que les dépôts matures compacts possèdent en majorité des formes A β 40. On peut noter également la participation de formes de peptides A β tronqués en amino-terminal (Kalback *et al.*, 2002) et en carboxy-terminal (Wiltfang *et al.*, 2002) dans la formation des dépôts, et ceci, à un stade infra-clinique de la MA (Sergeant *et al.*, 2003). Ces dépôts amyloïdes, agrégés sous la forme de feuillets β -plissés à caractère argyrophile, sont visualisables par différentes techniques telles que les imprégnations argentiques (coloration au Gallyas, Bodian ou Bielchowski), le marquage par des intercalants de feuillets β comme le

rouge congo et la Thioflavine S, ou encore l'immunohistochimie basée sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre le peptide A β (Figure 9, p.32).

La découverte en 1991 de mutations dans le gène de l'APP (pour revue (Hardy and Higgins, 1992) associées à certaines formes précoces de MA (< 65 ans) a conduit à l'évocation des formes familiales autosomiques dominantes de MA appelées FAD pour « *Familial Alzheimer Disease* ». Depuis, on sait également que des mutations dans les gènes d'enzymes impliquées dans le métabolisme de l'APP appelées Présénilines 1 et 2 (enzymes responsables de l'activité γ -sécrétase) ainsi que la duplication partielle ou complète du gène de l'APP sont également responsables de ces rares formes familiales (1% de toutes les formes de MA).

2.2.2.2.b La dégénérescence Neurofibrillaire

La dégénérescence neurofibrillaire correspond à l'accumulation intra-neuronale de protéines Tau (Brion, 1985; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986a) sous la forme de filaments appariés en hélice appelés PHF pour « *Paired Helical Filaments* » et visibles en microscopie électronique (Kidd, 1963). Ces agrégats intra-cytoplasmiques de protéines Tau, ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que les dépôts amyloïdes, seront visualisés par les mêmes techniques (coloration au Gallyas ou Bielchowski, rouge congo et la Thioflavine S) (Figure 10, p.33).

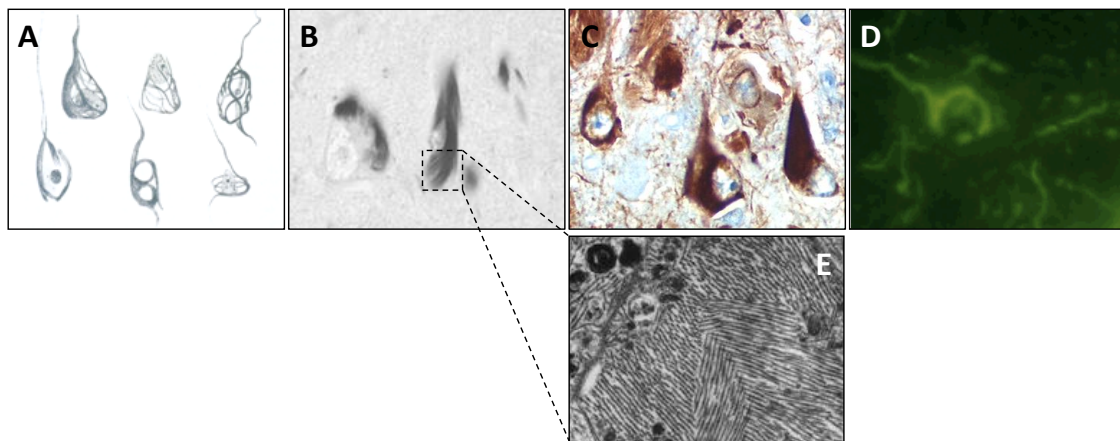


Figure 10 : Aspects microscopiques de la dégénérescence neurofibrillaire et techniques de marquage :

(A) Dessins originaux d'Aloïs Alzheimer (1907). (B) Imprégnation argentique de la lésion par coloration au Gallyas. (C) Marquage immunohistochimique de la lésion au moyen d'anticorps dirigés contre la protéine Tau (Pr CA Maurage CHRU Lille). (D) Marquage de la lésion par la Thioflavine S, un intercalant des feuillettes β -plissés. (E) Aspects des filaments appariés en hélice (PHFs) visualisés en microscopie électronique (Pr CA Maurage CHRU Lille).

Cette lésion atteint les neurones corticaux et peut être classée, au cours du processus dégénératif, en trois stades d'évolution cytotologique : le stade précoce « pré-tangle », le stade intermédiaire « intra-tangle » et le stade ultime « extra-Tangle » ou « ghost tangle » (Augustinack *et al.*, 2002) ([Figure 11, p.34](#)).

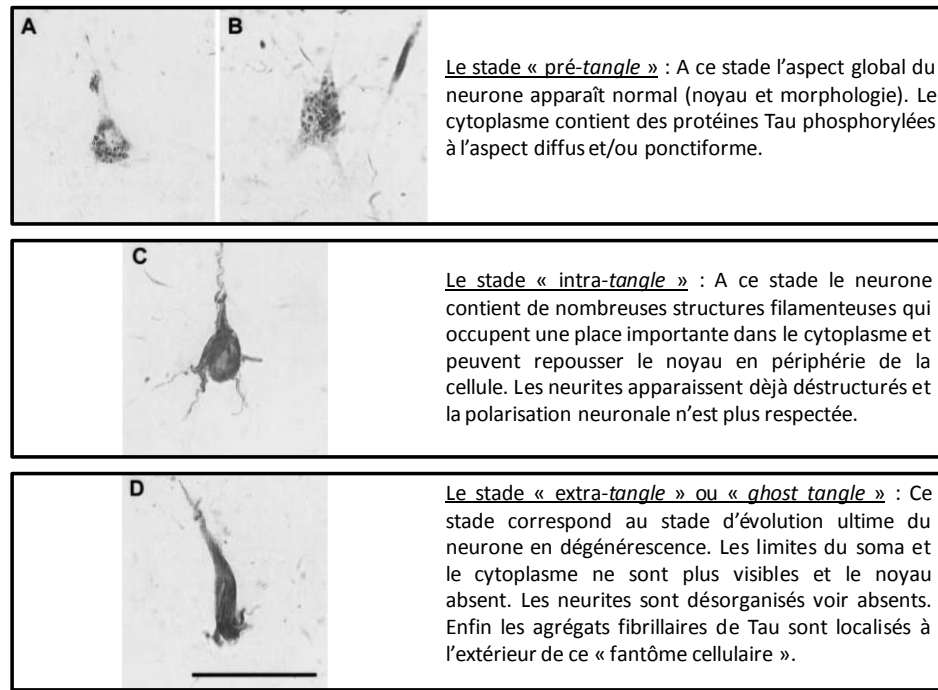


Figure 11 : Les trois stades d'évolution cytotologique de la dégénérescence neurofibrillaire, au cours de la Maladie d'Alzheimer et adaptés d'après (Augustinack *et al.*, 2002).

Outre cette évolution cytotologique, la DNF se distribuera, au niveau des territoires corticaux, suivant une progression spatio-temporelle hiérarchisée, séquentielle, invariable et corrélée de façon étroite aux signes cliniques observés (Arriagada *et al.*, 1992). En effet, les travaux histologiques de Braak et Braak ont pu, dans un premier temps, subdiviser la progression de cette DNF en 6 stades (Braak and Braak, 1991) ([Figure 12A, p.35](#)):

- Stade I et II « trans-entorhinaux »: Ces stades de la pathologie sont retrouvés dans les formes de la maladie les plus modérées et correspondent respectivement à l'envahissement progressif et à l'atteinte du cortex trans-entorhinal par la DNF.

- Stade III et IV: Ces stades représentent les stades dits « limbiques » de la pathologie et voient la DNF envahir le territoire hippocampique. L'isocortex est encore intact à ce stade.
- Stade V et VI « isocorticaux »: Ces stades correspondent à l'atteinte progressive des territoires de l'isocortex allant des aires associatives isocorticales, passant par les aires sensorielles primaires pour finir dans les aires corticales primaires.

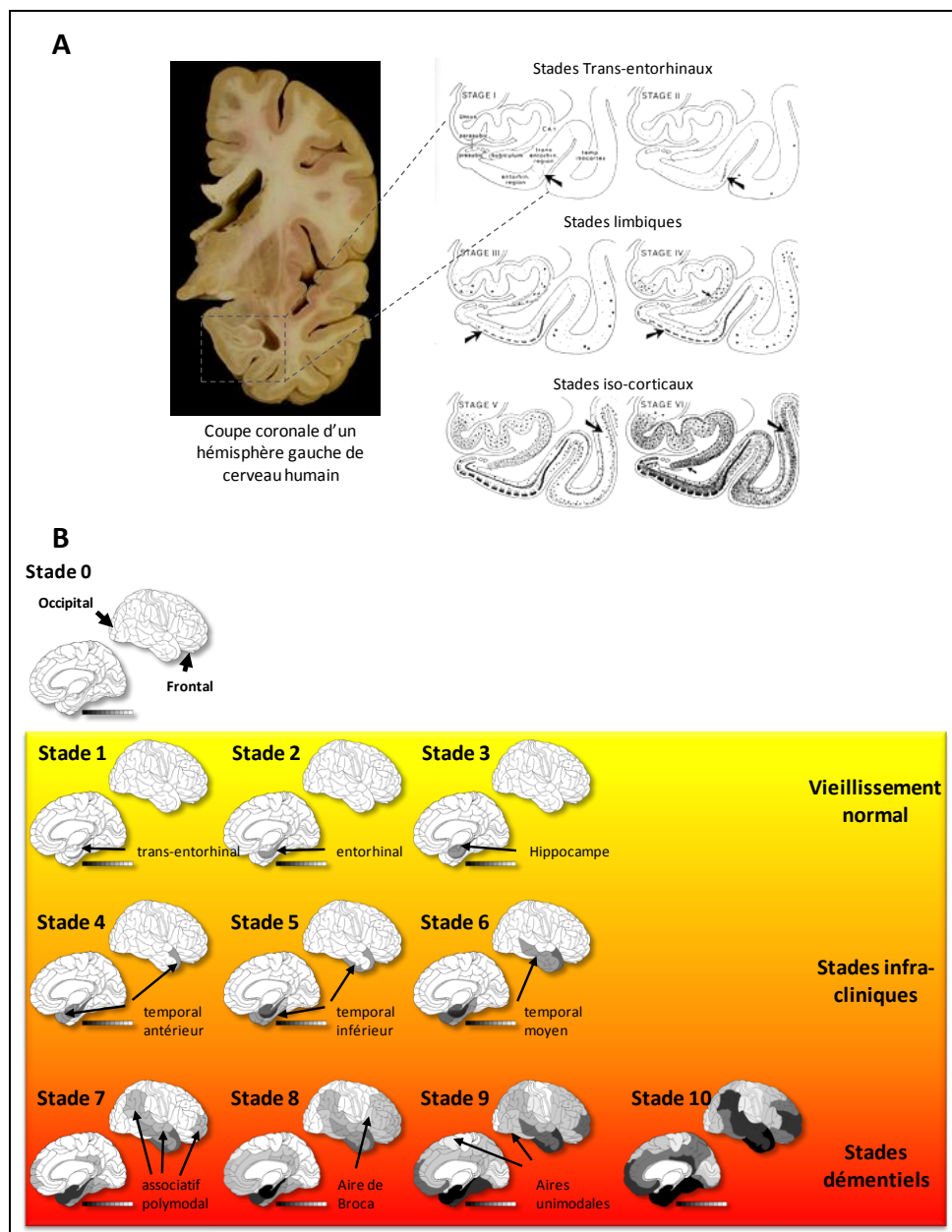


Figure 12 : Progression de la dégénérescence neurofibrillaire au cours de la Maladie d'Alzheimer :

(A) Progression en 6 stades histologiques de la DNF indiquée par les flèches en noir selon (Braak and Braak, 1991) (B) Progression de la DNF en 10 stades biochimiques selon (Delacourte *et al.*, 1999).

De façon plus récente, l'analyse biochimique et quantitative des protéines Tau agrégées extraites de plusieurs territoires corticaux à différents stades de la maladie a pu étendre cette échelle de progression spatio-temporelle à 10 stades qui est corrélée au déclin cognitif de la pathologie ([Figure 12B, p.35](#)) (Delacourte *et al.*, 1999).

2.2.2.2.c L'interrelation entre les deux lésions

La nature de la relation existante entre les deux lésions reste à l'heure actuelle encore assez discutée. Cependant, on peut rappeler que l'existence de rares formes familiales autosomiques dominantes de Maladie d'Alzheimer (1%) causées par des altérations génétiques affectant les voies métaboliques de l'APP, a conduit la communauté scientifique à formuler l'hypothèse physiopathologique de la « cascade amyloïde » (Hardy and Higgins, 1992) ([Figure 13, p.36](#)).

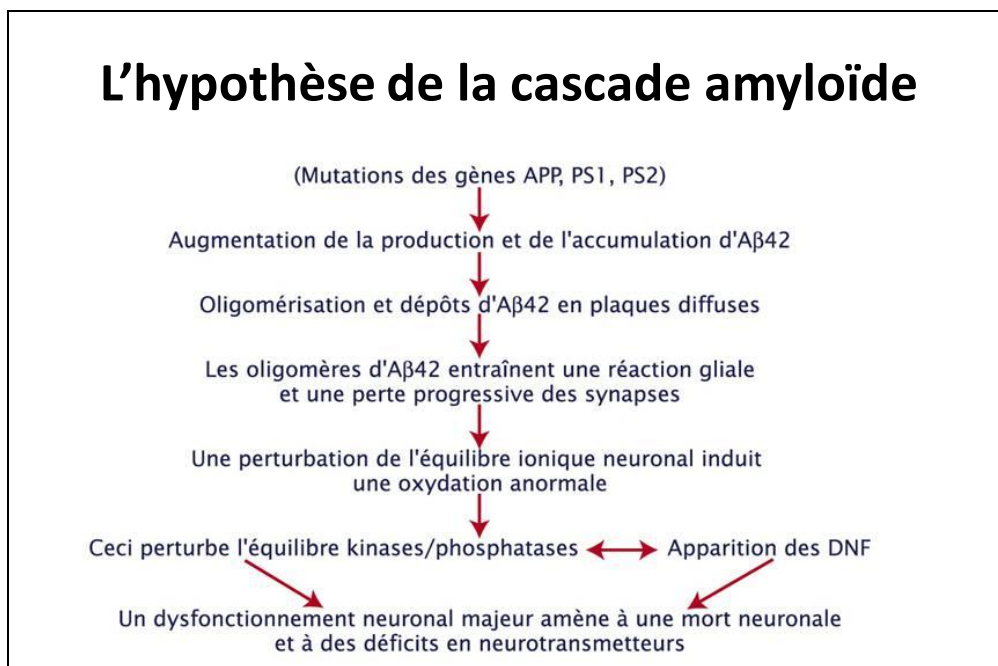


Figure 13: Illustration de la cascade d'événements reliant la pathologie amyloïde à la dégénérescenceneurofibrillaire selon (Hardy and Selkoe, 2002).

Dans cette théorie, le peptide amyloïde-β est l'élément déclencheur de la pathologie et provoque secondairement un stress cellulaire responsable d'une cascade d'événements moléculaires aboutissant à la dérégulation de la phosphorylation de Tau et à son agrégation sous forme de PHFs. Cependant, l'analyse des modèles *in vivo* présentant d'importants dépôts

amyloïdes et basés sur des mutations du gène APP (Games *et al.*, 1995) et Préséniline (Duff *et al.*, 1996) ne révèle pas l'existence d'une DNF et d'une perte neuronale importante. *A contrario*, les modèles de DNF, basés sur des mutations pathologiques de Tau (mutations DFTP-17 [cf.§3.2.1, p.49](#)) ne montrent pas de dépôts amyloïdes mais présentent une mort neuronale (pour revue (McGowan *et al.*, 2006)). Ces données, associées au fait que l'analyse de cerveaux humains de patients atteints de la MA révèle toujours la présence d'une DNF avant l'apparition de dépôts amyloïdes, ont conduit à revisiter l'hypothèse physiopathologique de la cascade amyloïde (Braak and Del Tredici, 2004; Delacourte *et al.*, 2002). Afin de préciser la nature de cette interrelation, des modèles murins combinant les deux types de lésions ont été envisagés. Ainsi, il a été montré que l'injection de peptide A β 42 agrégé potentialise la pathologie Tau observée dans un modèle de dégénérescenceneurofibrillaire basé sur l'expression d'une protéine Tau mutée (Gotz *et al.*, 2001b). De la même façon, des souris double transgéniques APP/Tau mutés montrent l'apparition précoce de la pathologie Tau par comparaison avec les souris transgéniques simples Tau mutée (Lewis *et al.*, 2001; Perez *et al.*, 2005; Ribe *et al.*, 2005).

Ces résultats pris ensemble renouvèle le sens de l'hypothèse de la cascade amyloïde, où le peptide amyloïde- β , s'il n'initie pas la pathologie Tau, pourrait la potentialiser (pour revue (McGowan *et al.*, 2006)). Cette hypothèse est renforcée par le fait que certaines études ont pu montrer que la pathologie Tau était un intermédiaire obligatoire à la neurotoxicité du peptide A β (Alvarez *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 2002; Rapoport *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2007). Enfin, l'analyse biochimique des pathologies Tau et amyloïde dans le cerveau humain, au cours de la MA, révèle que seule la DNF est corrélée au déclin cognitif et à la neurodégénérescence (Braak and Del Tredici, 2004; Delacourte *et al.*, 1999; Delacourte *et al.*, 2002) et que la pathologie A β , en revanche, pourrait agir en synergie avec la pathologie Tau et permettre son extension à l'ensemble des territoires corticaux (Delacourte *et al.*, 2002).

3 Mécanismes moléculaires de la dégénérescence neurofibrillaire

Comme décrit précédemment, la DNF semble être corrélée au déclin cognitif et apparaît comme une lésion délétère située au cœur de la mort neuronale observée dans la MA et les Tauopathies. Comprendre les mécanismes de cette lésion semble donc un pré-requis à la compréhension et au développement de stratégies thérapeutiques visant l'étiopathologie de la MA et de l'ensemble des Tauopathies. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux mécanismes moléculaires qui caractérisent cette lésion et en particulier aux études qui se sont portées sur la dérégulation de la phosphorylation de Tau et les acteurs responsables de cette dérégulation.

3.1 Dérégulation de la phosphorylation de Tau

La dégénérescenceneurofibrillaire correspond à l'agrégation intra-neuronale de protéines Tau qualifiées de pathologiques. Dans, la MA, ces protéines Tau pathologiques (Tau PHFs) vont présenter de nombreuses modifications post-traductionnelles dont la signification exacte n'est pas encore bien établie. Parmi elles, on retrouve la N-/O-glycosylation, la glycation, l'oxydation, l'ubiquitination (pour revues (Chen *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005; Sergeant *et al.*, 2005).

De façon plus importante et quelle que soit la Tauopathie, ces protéines Tau pathologiques ont pour point commun de présenter un état de phosphorylation fortement dérégulé (Goedert *et al.*, 1992; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986b; Hanger *et al.*, 1998; Morishima-Kawashima *et al.*, 1995). Cette dérégulation de phosphorylation est le résultat de deux processus différents : l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale.

3.1.1 Hyperphosphorylation

L'Hyperphosphorylation se définit par une augmentation de l'état de phosphorylation des protéines Tau. Le développement d'outils immunologiques a pu mettre en évidence qu'une grande partie des sites, tels que les épitopes reconnus par les anticorps AD2/PHF-1 (Buee-Scherrer *et al.*, 1996; Condamines *et al.*, 1995; Greenberg *et al.*, 1992; Otvos *et al.*, 1994), AT8 (Mercken *et al.*, 1992 ; Porzig *et al.*, 2007), AT270 (Goedert *et al.*, 1994;

Mercken *et al.*, 1992), 12E8 (Seubert *et al.*, 1995), AT180 (Goedert *et al.*, 1994; Mercken *et al.*, 1992)) (Figure 14A, p.39) (et pour revue (Morishima-Kawashima *et al.*, 1995), étaient retrouvés faiblement phosphorylés sur les protéines Tau normales.

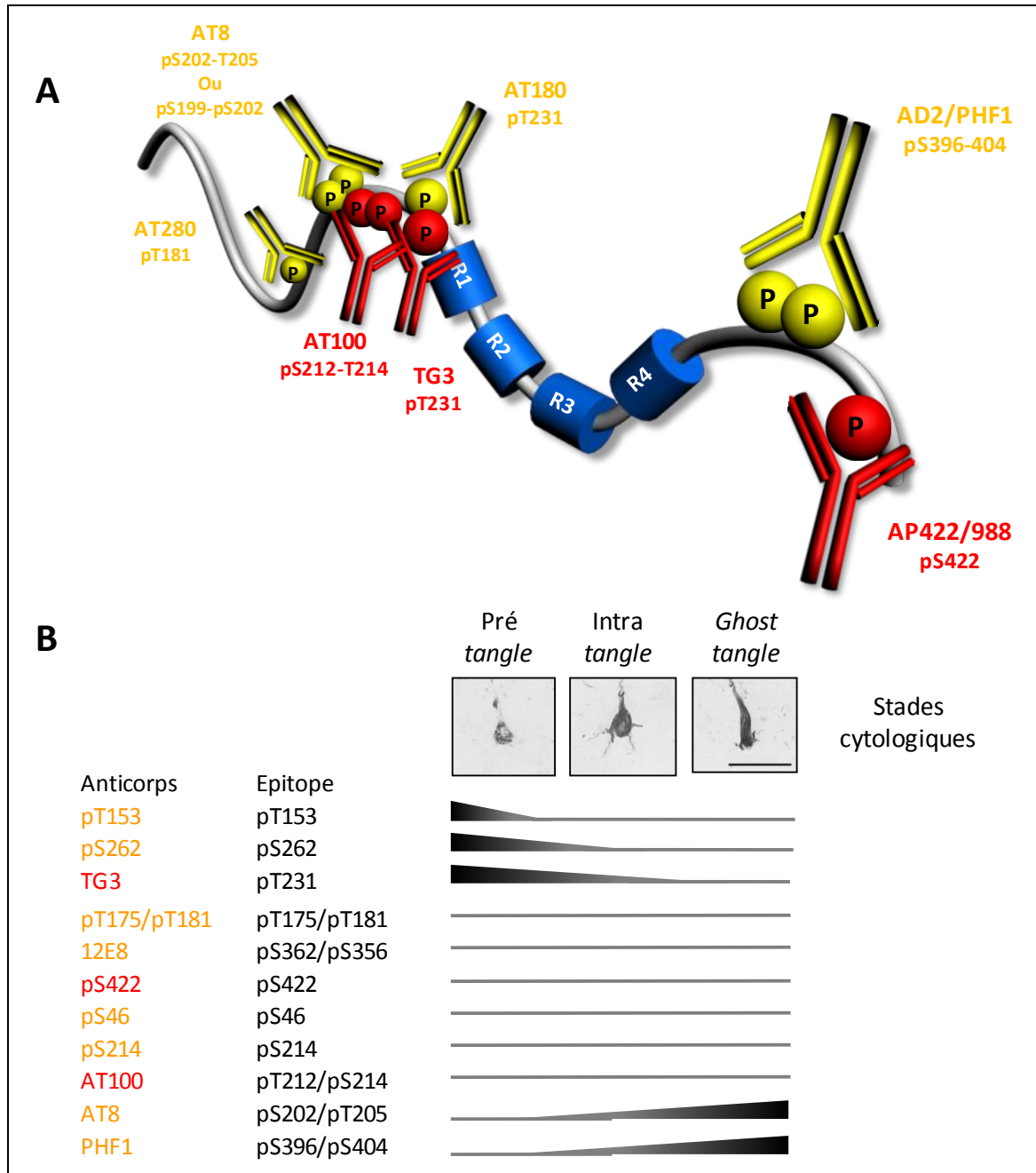


Figure 14 : Dérégulation de la phosphorylation de Tau et sondes immunologiques :

(A) Représentation schématique d'une isoforme de Tau à 4 domaines de répétition (R1 à R4), de quelques uns des principaux sites de phosphorylation dérégulés dans la MA et des anticorps dirigés contre ces épitopes de phosphorylation. (B) Séquence d'apparition des sites de phosphorylation de Tau au cours des stades d'évolution cytotologique de la DNF (Figure 11, p.34), mise en évidence par immunohistochimie au moyen d'anticorps spécifiques dirigés contre des sites de phosphorylation selon (Augustinack *et al.*, 2002).

L'hyperphosphorylation des Tau PHFs correspond à la fois à 1) une augmentation importante de la proportion de protéines Tau phosphorylées à un site donné et 2) à une augmentation du nombre de groupements phosphates par molécule de Tau pathologique 3 à 4 fois supérieure aux protéines Tau normales (2 à 3 moles de phosphate par mole de Tau normale) (Kopke *et al.*, 1993; Ksiezak-Reding *et al.*, 1992) et (pour revue (Gong *et al.*, 2005). Ainsi, l'analyse combinée par immunoempreinte et/ou spectrométrie de masse a révélé l'existence d'au moins 25 sites phosphorylés au sein des Tau PHFs (Hanger *et al.*, 1998). Cette augmentation de l'incorporation de groupements phosphates par molécule de Tau va conférer des caractéristiques électrophorétiques particulières aux Tau PHFs, telles que le regroupement des six isoformes de Tau sous la forme d'un triplet pathologique, qui représente la signature biochimique des protéines Tau de la MA (cf. §2.1. p.27). En plus, l'augmentation de charges négatives apportées par ces groupements phosphates va entraîner une augmentation de l'acidité de Tau, détectable au cours de l'analyse des protéines Tau par électrophorèse bidimensionnelle (Sergeant *et al.*, 1995).

3.1.2 Phosphorylation anormale

Le deuxième processus qui caractérise la dérégulation de l'état de phosphorylation de Tau est la phosphorylation anormale. Ce processus correspond à l'apparition d'un petit nombre d'épitopes phosphorylés, spécifiques aux Tau PHFs. Ces épitopes correspondent à la phosphorylation des Ser212 et Thr214, de la Thr231 ainsi que de la Ser422 de Tau. De la même façon, le développement d'outils immunologiques tels que l'anticorps AT100 (Hoffmann *et al.*, 1997; Mercken *et al.*, 1992), TG3 (Jicha *et al.*, 1997b) et 988/AP422 (Bussiere *et al.*, 1999 ; Hasegawa *et al.*, 1996) ([Figure 14A, p.39](#)), dirigés respectivement contre les épitopes cités ci-dessus, a permis de montrer que cette phosphorylation anormale était retrouvée uniquement dans les cerveaux de patients atteints de la MA et jamais dans des cerveaux de sujets sains. Enfin, on peut noter que certains de ces épitopes de phosphorylation comme l'épitope TG-3 sont des épitopes conformationnels.

En effet, les protéines Tau PHFs anormalement phosphorylées présentent des changements de conformation importants (Ghoshal *et al.*, 2002) qui sont détectés par des anticorps spécifiques comme les anticorps Alz-50 (Jicha *et al.*, 1997a; Riekkinen *et al.*, 1987) et MC-1 (Jicha *et al.*, 1997a; Riekkinen *et al.*, 1987).

De façon générale, le rôle exact de l'hyperphosphorylation et de la phosphorylation anormale au cours de la DNF reste encore à éclaircir. En effet, s'il a été montré que certains sites de phosphorylation de Tau (Thr231, Ser262 et Ser356) étaient impliqués dans la régulation de la liaison de Tau aux microtubules, le rôle physiologique de la phosphorylation aux autres sites reste encore mal connu. Ainsi, certaines études récentes supposent un rôle spécifique de certains épitopes de phosphorylation (AT8 et AD2) dans l'adressage des formes phosphorylées de Tau vers les systèmes de dégradation (Dickey *et al.*, 2006a; Shimura *et al.*, 2004b). En outre, l'existence d'une apparition chronologique des sites de phosphorylation au cours de l'évolution cytologique de la DNF (Augustinack *et al.*, 2002) ([Figure 14B, p.39](#)), laisse également supposer un rôle différentiel de ces épitopes de phosphorylation au cours du processus pathologique. Cependant, si le rôle physiologique des sites de phosphorylation impliqués est mal connu, *a fortiori*, leur signification au cours du processus dégénératif reste encore à préciser. Enfin, on ne peut pas exclure que l'apparition chronologique de ces épitopes de phosphorylation pourrait être également le résultat de l'intervention séquentielle d'acteurs impliqués dans la régulation de la phosphorylation de Tau. Dans ce contexte, de nombreuses études se sont focalisées sur l'identification des acteurs impliqués dans la dérégulation de la phosphorylation de Tau.

3.1.3 Acteurs de la dérégulation de la phosphorylation de Tau

Comme décrit précédemment ([cf.1.2.3.1, p.17](#)), la régulation de la phosphorylation est un phénomène complexe faisant intervenir un grand nombre d'acteurs. Ainsi, un des challenges de la recherche a été d'identifier les acteurs responsables de la dérégulation de l'état de phosphorylation des protéines Tau pathologiques.

L'augmentation du niveau de phosphorylation des protéines Tau pathologiques peut être due, en partie, soit à une augmentation de l'activité kinasique soit à l'inverse à une diminution de l'activité phosphatasique. En raison du grand nombre de kinases capables de phosphoryler Tau ([Tableau 2, p.18](#)), la difficulté concerne, en premier lieu, l'identification de celles impliquées dans cette dérégulation. De l'ensemble des travaux menés sur ce sujet, il ressort que deux kinases semblent être majoritairement impliquées dans cette dérégulation. Initialement appelées TPK I et II pour « *Tau protein Kinases I et II* », ces kinases, co-purifiées avec les Tau-PHF, ont été secondairement identifiées comme étant respectivement la GSK-3 β (Ishiguro *et al.*, 1993) et la Cdk5 (Kobayashi *et al.*, 1993).

3.1.3.1 La Glycogène Synthase kinase 3- β

La Glycogène Synthase kinase 3- β est une kinase initialement décrite comme impliquée dans la régulation du métabolisme du glycogène et dans d'autres mécanismes biologiques fondamentaux tels que le développement embryonnaire, la mort cellulaire et l'oncogenèse (pour revue (Cohen and Frame, 2001)). En outre, cette kinase est exprimée de façon importante au niveau du cerveau et elle est impliquée dans la régulation de la phosphorylation de Tau. En effet, cette kinase est capable *in vitro* de phosphoryler Tau sur une vingtaine de sites dont la plupart sont retrouvés sur les Tau pathologiques ([Tableau 2, p.18](#)).

Le mode de phosphorylation par GSK-3 β est double puisque celle-ci peut phosphoryler, soit des substrats pré-phosphorylés en position p₀+4 par rapport au site à phosphoryler en position p₀ (« *primed substrate* ») soit, avec une plus faible efficacité, des substrats ne présentant pas de phosphorylation préalable (Frame *et al.*, 2001). Néanmoins, on peut noter que cette phosphorylation séquentielle semble importante dans la genèse d'épitopes retrouvés sur les Tau pathologiques tels que les épitopes AT100, AT180 et AD2/PHF-1 ([cf.§1.2.3.1 p.17](#)). L'activité de GSK-3 β est régulée par la phosphorylation de deux sites majeurs : la Tyr216 et la Ser9. Une fois phosphorylée en Tyr216, la GSK-3 β présente une augmentation de son activité (Kim *et al.*, 1999). A l'inverse, la phosphorylation à la Ser9 agit comme un compétiteur du domaine catalytique de l'enzyme et mène à une diminution de son activité (Yuan *et al.*, 2004). Enfin, on peut noter que cette régulation physiologique de l'activité de la GSK-3 β met en jeu différentes kinases et de façon importante la voie PI3K/Akt (Grimes and Jope, 2001).

In vivo, la surexpression, dans des souris transgéniques, de GSK-3 β sauvage ou de mutants constitutivement actifs par mutation du résidu Ser9 en Ala (GSK-3 β S9A) entraîne une augmentation importante de la phosphorylation de Tau au niveau des épitopes reconnus par les anticorps AT8, PHF-1/AD2 et AT180 (Brownlee *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 2001; Spittaels *et al.*, 2000). A l'inverse, l'inhibition de la kinase par le Chlorure de Lithium (LiCl), un inhibiteur sélectif de son activité, entraîne une diminution de la phosphorylation de Tau dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe et de cervelet (Hong *et al.*, 1997; Munoz-Montano *et al.*, 1997).

Concernant la relation GSK-3 β et DNF, les études de cerveaux de sujets atteints de MA n'ont pas révélé de co-localisation de GSK-3 β avec les stades tardifs de l'évolution des neurones en dégénérescence. En revanche, la GSK-3 β s'accumule sous sa forme active dans les neurones en stade « *pré-tangle* » (Leroy *et al.*, 2007; Pei *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que cette kinase pourrait intervenir de façon précoce dans la dérégulation de la phosphorylation de Tau au cours de la DNF.

De façon intéressante, il a été montré que la GSK-3 β pouvait être à l'interface de la pathologie amyloïde et de la pathologie Tau. En effet, l'exposition de cultures de neurones hippocampiques de rat au peptide amyloïde- β entraîne une augmentation de la phosphorylation de Tau par l'intermédiaire de l'inhibition de la voie PI3K/Akt et donc l'activation de la GSK-3 β (Takashima *et al.*, 1998a; Takashima *et al.*, 1996). De la même façon, l'inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt semble être un des liens entre les mutations Présénilines 1 (PS1) et l'augmentation de la phosphorylation de Tau dans les FAD (Baki *et al.*, 2004). De plus, des données obtenues dans des modèles *in cellulo* (Baki *et al.*, 2004; Pigino *et al.*, 2001; Takashima *et al.*, 1998b) et *in vivo* (Tanemura *et al.*, 2006) montrent une augmentation de la phosphorylation de Tau après surexpression de mutants PS1. Enfin, la PS1 en liant directement la GSK-3 β pourrait favoriser directement son activité kinasique vis-à-vis de Tau (Takashima *et al.*, 1998b).

Ces données sont également à relier avec l'observation d'une diminution de la neurotrophine BDNF pour « *Brain Derived Neurotrophic Factor* » dans l'hippocampe des patients atteints de la MA (Fahnestock *et al.*, 2002; Phillips *et al.*, 1991). En effet, de façon physiologique, le BDNF exerce son action biologique par la transactivation de son récepteur TrkB et déclenche l'activation de voies de signalisation intracellulaires telles que la voie PI3K/Akt. Ainsi, une étude, menée dans un modèle cellulaire, a pu montrer que le BDNF est capable d'induire une inactivation de GSK-3 β par le biais de l'activation de la voie PI3K/Akt et conduit à une déphosphorylation de Tau à l'épitope AT8 (Elliott *et al.*, 2005). Une diminution du taux de BDNF dans la MA pourrait donc à l'opposé conduire à une diminution de l'activité de cette voie de signalisation et donc à l'hyperphosphorylation de Tau ([Figure 15, p.44](#)).

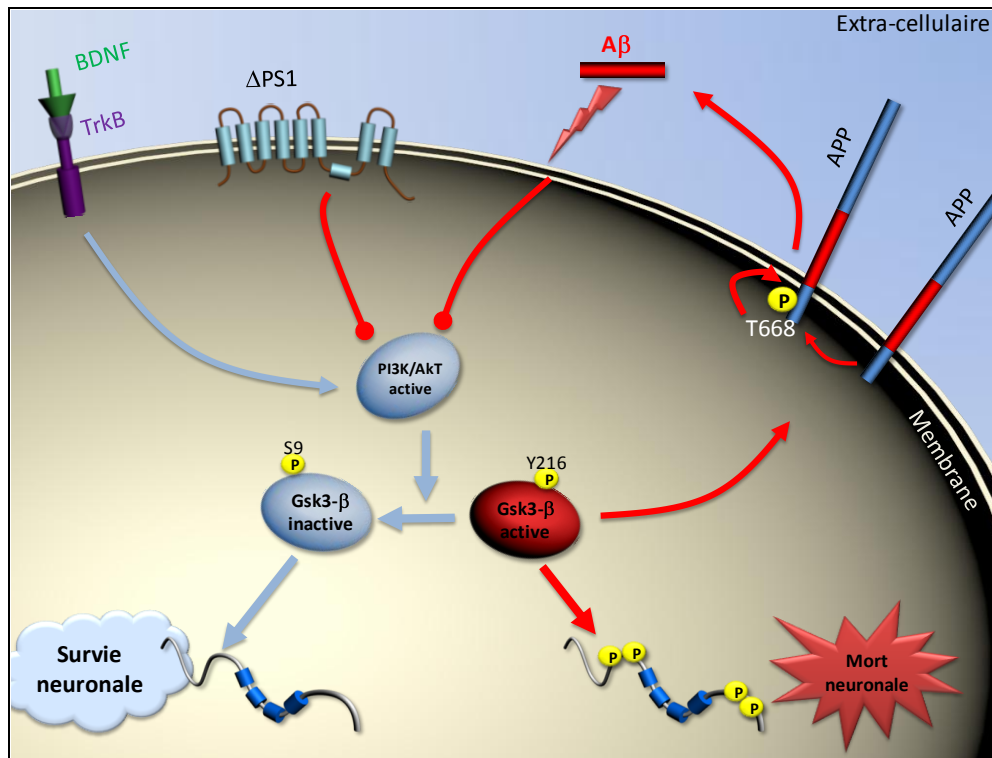


Figure 15 : Représentation schématique des voies de régulation de la GSK3- β impliquées dans la Maladie d'Alzheimer.

Les voies en bleu sont en faveur d'une protéine Tau déphosphorylée alors que les voies en rouge favorisent la phosphorylation de Tau. Les pointes de flèches symbolisent une activation (\blacktriangleright) alors que les cercles plein (\bullet) représentent une inhibition.

De façon intéressante, la GSK-3 β est également capable de phosphoryler la Thr668 de l'APP (Aplin *et al.*, 1996), un site de phosphorylation impliqué dans la régulation du métabolisme de cette protéine et la production du peptide amyloïde- β (Ando *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003). Par ce biais, la GSK-3 β sous sa forme active entretient une boucle de rétrocontrôle positif en favorisant la production du peptide amyloïde- β , qui, à son tour, favorise son activation via la voie PI3K/Akt (Figure 15, p.44).

En résumé, ces données, prises ensemble, suggèrent que la voie de signalisation PI3K/Akt/GSK-3 β est impliquée dans la dérégulation de la phosphorylation de Tau observée dans la DNF. Une diminution de l'activité de cette voie PI3K/Akt suite à une diminution de l'apport en neurotrophines comme le BDNF ou à l'exposition à d'autres facteurs (A β , mutations PS1), dans la MA, pourrait participer à la dérégulation précoce de la phosphorylation de Tau. Cependant, l'analyse de modèles de souris surexprimant cette kinase

n'a pas révélée l'existence d'une agrégation de Tau suggérant que cette kinase n'est pas à elle seule responsable de la DNF.

3.1.3.2 La kinase Cdk5

3.1.3.2.a Le complexe physiologique p35/Cdk5

La Cdk5, encore appelée *neuronal Cdc2-like kinase* (NCLK), est une « *prolin directed kinase* » qui présente une très forte homologie de séquence avec les kinases Cdk1 et Cdk2. Cette kinase est exprimée de façon ubiquitaire mais présente une expression et une activité très importante au niveau du SNC. Au sein de ce dernier, cette kinase à activité neuronale est impliquée dans de nombreuses fonctions vitales pour le neurone telles que la migration neuronale lors de la mise en place du SNC, la guidance axonale, la stabilité des microtubules et du cytosquelette d'actine. Elle est également impliquée dans la structure et la plasticité synaptique (pour revues (Dhavan and Tsai, 2001; Tsai *et al.*, 2004).

La Cdk5 seule ne présente aucune activité. En effet, cette kinase n'est rendue active qu'après interaction avec ses protéines de régulation neuronale p35 et p39. Son activateur majoritaire p35 est une protéine de 307 AA (35kD) qui se compose de deux domaines principaux : 1) Un domaine C-terminal de 209 AA, qui correspond au domaine de liaison de p35 à Cdk5 et 2) un domaine N-terminal de 98 AA comprenant principalement un site de myristoylation pour l'ancrage de p35 à la membrane plasmique et un site signal pour la dégradation de p35 par le protéasome. La présence de ces deux éléments vont déterminer deux paramètres importants pour l'activité du complexe p35/Cdk5, à savoir : 1) une localisation principalement juxta-membranaire de ce complexe kinasique 2) une activité transitoire en raison de la demi-vie courte de p35 (de l'ordre de 20 à 30 minutes). De plus, Cdk5 peut phosphoryler p35 et favoriser ainsi sa dégradation par le protéasome. Ce mécanisme de régulation, opérant comme une boucle de rétrocontrôle négatif (Patrick *et al.*, 1998), montre que l'activité de Cdk5 est étroitement contrôlée.

3.1.3.2.b Dérégulation de l'activité Cdk5 par l'activateur pathologique p25

Outre sa régulation physiologique, la Cdk5 est également activée par son interaction avec la protéine p25, produit C-terminal obtenu en conditions de stress cellulaire après clivage de son précurseur p35 par des protéases de stress appelées calpaïnes ([Figure 16, p.47](#)). Parmi

ces conditions, on peut noter que l'exposition de cultures primaires de neurones corticaux à un stress oxydant, à un stress excitotoxique (lors de l'ischémie par exemple) et, de façon intéressante, au peptide amyloïde- β est capable d'entraîner le clivage de p35 et la production de l'activateur pathologique p25 (Lee *et al.*, 2000). Une fois produit, p25 va conduire à deux modifications majeures de l'activité Cdk5. En effet, ne comportant plus le site de myristoylation, le complexe p25/Cdk5 sera retrouvé au niveau cytoplasmique et nucléaire. La deuxième modification concerne la demi-vie de p25 qui est plus importante que celle de p35. En conséquence, après clivage de p35 en p25, l'activité kinasique Cdk5 sera soutenue dans le temps et pourra cibler des substrats nucléaires et cytoplasmiques non physiologiques tels que la protéine Tau donné à titre d'exemple.

3.1.3.2.c p25/ Cdk5 un complexe impliqué dans la dégénérescence neuronale de la MA

Un certain nombre d'évidences associent le complexe p25/Cdk5 à la dégénérescence neuronale dans les maladies neurodégénératives (MA, SLA, Maladie de Niemann de type C, la Maladie de Parkinson et la paralysie supranucléaire progressive). En ce qui concerne la MA, p25 a été retrouvée dans les cerveaux des patients atteints (Patrick *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 2002) et l'activité de Cdk5 apparaît augmentée, de façon précoce, au cours du processus pathologique (Lee *et al.*, 1999). De plus, il a été montré *in vitro* que le complexe p25/Cdk5 est capable de phosphoryler Tau sur une dizaine de sites dont la phosphorylation est retrouvée dérégulée sur les protéines Tau pathologiques.

L'ensemble de ces données suggèrent que ce complexe p25/Cdk5 est potentiellement impliqué dans la DNF. Afin de vérifier cette hypothèse, des modèles cellulaires et murins basés sur la surexpression de p25 ont été développés. Ainsi, la surexpression de p25 dans un contexte cellulaire de type neuronal, aboutit à la formation d'un complexe p25/Cdk5 fonctionnel responsable de l'apparition d'une phosphorylation anormale de type mitotique à l'épitope TG-3 (Thr231 de Tau) (Hamdane *et al.*, 2003a; Hamdane *et al.*, 2003b).

Enfin, *in vivo*, alors que le complexe physiologique p35/Cdk5 ne semble pas avoir d'effets majeurs sur la phosphorylation de Tau (Van den Haute *et al.*, 2001), le complexe p25/Cdk5 induit une hyperphosphorylation de Tau aux sites Ser202, Ser396/Ser404, Thr181 et Thr231 dans les souris transgéniques (Ahlijanian *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 2003; Noble *et al.*, 2003; Otth *et al.*, 2002). Il a été également montré que ce complexe était

capable de potentialiser la pathologie Tau dans un modèle de DNF, basé sur des mutations pathologiques de Tau (DFTP-17) (Noble *et al.*, 2003).

Enfin, de façon plus importante, la surexpression de p25 semble capable, à elle seule, d'entraîner une dégénérescence neuronale présentant les caractéristiques majeures de la DNF, avec une agrégation de Tau anormalement phosphorylée et une mort neuronale (Cruz *et al.*, 2003).

De plus, la Cdk5 est une kinase candidate répondant également à l'hypothèse générale de la « cascade amyloïde » où le peptide amyloïde- β , dans ce cas précis, entraîne une augmentation de l'activité kinasique de Cdk5 par le biais du clivage de p35 en p25. Comme pour la GSK-3 β , la Cdk5 est capable de phosphoryler la Thr668 de l'APP et favorise ainsi la production de peptide amyloïde- β (Ando *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003) au cours d'une boucle de rétrocontrôle positif (Figure 16, p.47). Cette hypothèse est appuyée par le fait que la surexpression de p25 dans un modèle murin mène à une augmentation de la production du peptide amyloïde- β (Cruz *et al.*, 2006).

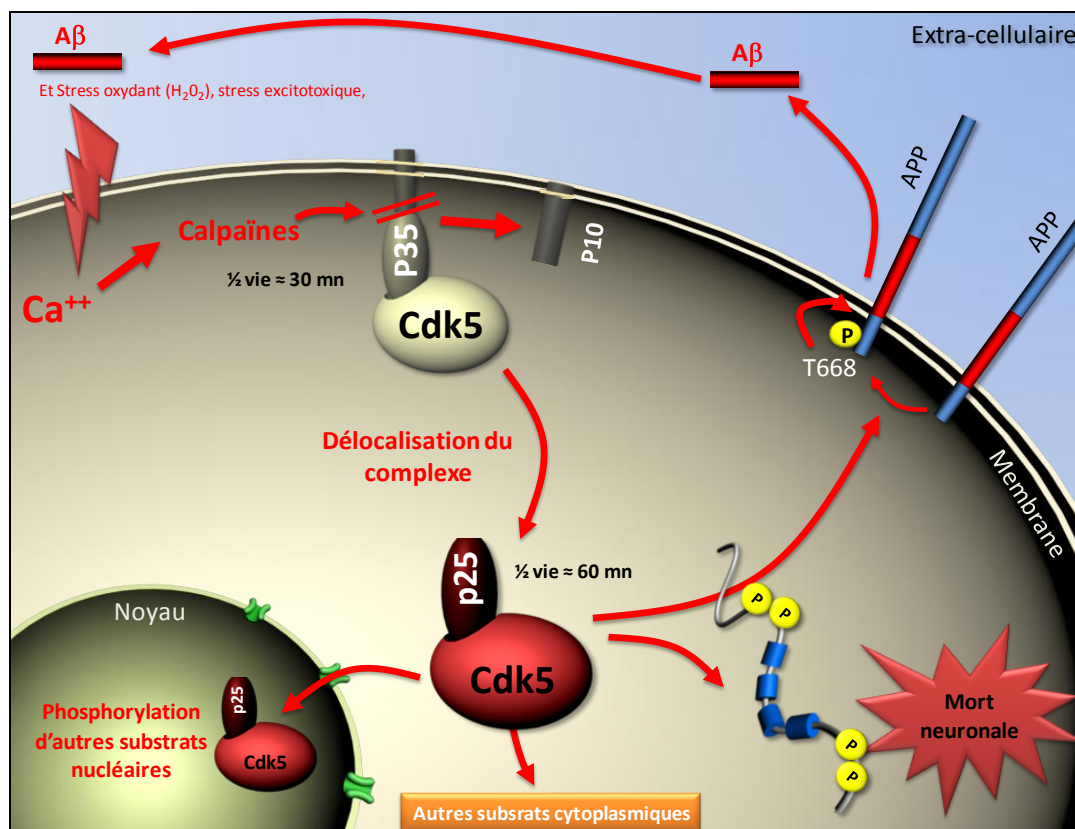


Figure 16 : Dérégulation de l'activité de Cdk5 par délocalisation subcellulaire et augmentation de son activité en réponse à un stress cellulaire :

Le stress cellulaire responsable d'un choc calcique entraîne secondairement une activation des calpaïnes et le clivage de p35 en p25 d'après (Dhavan and Tsai, 2001).

En résumé le complexe kinasique p25/Cdk5 semble être un élément impliqué de façon importante dans la cascade délétère menant à la DNF au cours de la MA. En effet, les données obtenues dans les cerveaux de patients MA ainsi que l'analyse des modèles in vivo montrent que l'activateur pathologique p25, à lui seul, peut entraîner et potentialiser une dérégulation de la phosphorylation et l'agrégation de Tau.

3.1.3.3 Autres acteurs

En raison du grand nombre de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau, il n'est pas exclu, dans la MA, que d'autres kinases peuvent participer à la dérégulation de sa phosphorylation. Parmi ces kinases, on peut citer les SAP kinases (SAPK1 γ /JNK, SAPK2 α /p38) (pour revue (Ferrer *et al.*, 2005), ou encore la CK1 (Kannanayakal *et al.*, 2006; Schwab *et al.*, 2000; Yasojima *et al.*, 2000) qui semblent être de bon candidats, à la vue de l'augmentation de leur niveau d'expression dans les cerveaux de patients atteints de la MA.

A l'inverse, l'inhibition des phosphatases *in cellulo* par traitement à l'acide okadaïque conduit à une hyperphosphorylation de Tau et à sa phosphorylation anormale aux épitopes 988/AP422 et AT100 (Bussiere *et al.*, 1999; Caillet-Boudin and Delacourte, 1996; Mailliot *et al.*, 1998). On peut donc concevoir qu'une diminution de l'activité des phosphatases comme PP2A observée au cours de la MA (Gong *et al.*, 1993; Sontag *et al.*, 2004), pourrait contribuer également à l'hyperphosphorylation de Tau.

Enfin, on peut noter qu'un dysfonctionnement de la protéine Pin1 est également évoqué dans la MA. Cette isomérase facilitant la déphosphorylation *in vitro* de Tau (Zhou *et al.*, 2000) et capable de restaurer en partie la fonction des protéines Tau pathologiques (Lu *et al.*, 1999), présente des modifications post-traductionnelles comme l'oxydation qui pourraient altérer son activité au cours de la MA (Sultana *et al.*, 2006). De plus, un polymorphisme du promoteur de Pin1, menant à une diminution de l'expression de Pin1, a été également associé au risque de développer une MA (Segat *et al.*, 2007) même si ces résultats font actuellement l'objet d'une controverse (Lambert *et al.*, 2006; Nowotny *et al.*, 2007). Enfin, des souris transgéniques invalidées pour le gène de Pin1 présentent des caractéristiques de DNF (Liou *et al.*, 2003).

En résumé, la dérégulation de la phosphorylation de Tau est une caractéristique commune à toutes les Tauopathies. Elle est également associée à certaines conditions pathologiques de stress neuronal comme l'ischémie par exemple (Morioka et al., 2006; Wen et al., 2004), et renforce ainsi l'hypothèse que cette dérégulation de phosphorylation de Tau est associée à un contexte pathologique.

L'étude des différents acteurs potentiellement impliqués dans cette dérégulation montre qu'elle résulte à la fois d'une augmentation de l'activité de certaines kinases (principalement GSK-3 β et Cdk5) et probablement de la diminution de l'activité de certaines phosphatases comme PP2A et d'agents facilitateurs de la déphosphorylation comme la protéine Pin1. Cependant, à ce jour, le rôle de la dérégulation de la phosphorylation de Tau ainsi que la participation relative des différents sites de phosphorylation à la cascade moléculaire conduisant à la DNF restent à préciser.

Afin de répondre à cette question, une partie importante de la recherche sur la MA et les Tauopathies a été consacrée au développement et à la caractérisation de modèles récapitulants en totalité ou en partie les caractéristiques moléculaires de la DNF.

3.2 Modélisation de la dégénérescence Neurofibrillaire

De nombreux modèles cellulaires et *in vivo* allant de *C.elegans* (Kraemer et al., 2003) aux modèles murins en passant par *D.melanogaster* (Wittmann et al., 2001) ont été développés afin d'étudier les mécanismes relatifs à la dysfonction de Tau dans les maladies neurodégénératives (et pour revue (Brandt et al., 2005 ; Hall and Yao, 2005). Cependant, une grande partie des recherches s'est orientée vers les modèles murins qui constituent des modèles physiologiques pertinents pour l'étude des maladies neurodégénératives. En effet, l'utilisation de tests comportementaux permettant l'évaluation des capacités mnésiques de ces animaux font de ces modèles des outils de choix pour l'étude de pathologies à troubles de mémoire.

3.2.1 Les modèles DFTP-17

Les premiers modèles à récapituler la quasi-totalité des marqueurs de la DNF sont apparus après la découverte en 1998 de mutations dans le gène de Tau (Hutton et al., 1998; Poorkaj et al., 1998) responsables de démences familiales : les DFTP-17 pour « Démences Frontotemporales avec syndrome Parkinsonien liées au chromosome 17 ». De manière succincte, les cerveaux de patients DFTP-17 se caractérisent, au niveau neuropathologique,

par une atrophie des lobes frontotemporaux et, au niveau histologique, par une dégénérescence neuronale associée à la présence d'inclusions de protéines Tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées. Généralement, ces cerveaux sont dépourvus de dépôts amyloïdes plaçant les mutations de Tau au cœur du processus dégénératif.

Actuellement, on recense 39 mutations pathologiques¹ de Tau qui sont retrouvées soit au niveau exonique (30 mutations) soit au niveau intronique (9 mutations) (pour revue (Kumar-Singh and Van Broeckhoven, 2007)). Les deux types de mutations agissent par des mécanismes distincts : les mutations exoniques auront des conséquences fonctionnelles en diminuant ou en augmentant la capacité de Tau à lier *in vitro* les microtubules (Delobel *et al.*, 2002b; Goode *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 1998; Hasegawa *et al.*, 1999; Maraganore *et al.*, 2004) alors que la majorité des mutations introniques, localisées dans l'intron 10-11, modifiera le rapport en isoformes de Tau en favorisant l'inclusion de l'exon 10 (augmentation du rapport 4R *versus* 3R) (pour revue (D'Souza and Schellenberg, 2005)).

Cependant, quelle que soit la mutation, toutes mènent, chez l'homme à une agrégation de protéines Tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées ainsi qu'à une dégénérescence neuronale.

3.2.1.1 Les modèles murins DFTP-17

Ces mutations, en raison de leur pathogénicité humaine, et leur propension à s'agréger *in vitro* (Gamblin *et al.*, 2000; Nacharaju *et al.*, 1999) ont été utilisées pour le développement de modèles murins de DNF. Ainsi, Lewis et collaborateurs publient le premier modèle de DNF, basé sur la surexpression d'une protéine Tau humaine portant la mutation P301L (Lewis *et al.*, 2000). Ce modèle murin présente, pour les souris homozygotes, une pathologie Tau débutant à 5 mois, caractérisée par une hyperphosphorylation de Tau à différents sites de phosphorylation dérégulés dans la MA, une phosphorylation anormale à l'épitope TG-3 et des changements de conformation spécifiques aux Tau pathologiques (épitoques MC-1 et Alz50). De plus, dans ce modèle, les protéines Tau P301L présentent une insolubilité mise en évidence par un fractionnement biochimique utilisant un agent de solubilité appelé sarkosyl. Cette protéine Tau insoluble forme des agrégats visualisables par des techniques d'imprégnation argentique (Gallyas, Bielchowski, Bodian) et des marqueurs spécifiques

¹ <http://www.molgen.ua.ac.be/FTDMutations>

comme le rouge congo ou la Thioflavine S, indiquant que ces agrégats se présentent sous la forme de feuillets β -plissés. Enfin, l'analyse microscopique des agrégats de Tau révèle la présence de nombreux filaments de structures similaires aux filaments observés dans la pathologie humaine et immunopositifs pour la protéine Tau hyperphosphorylée ([Figure 17, p.51](#)).

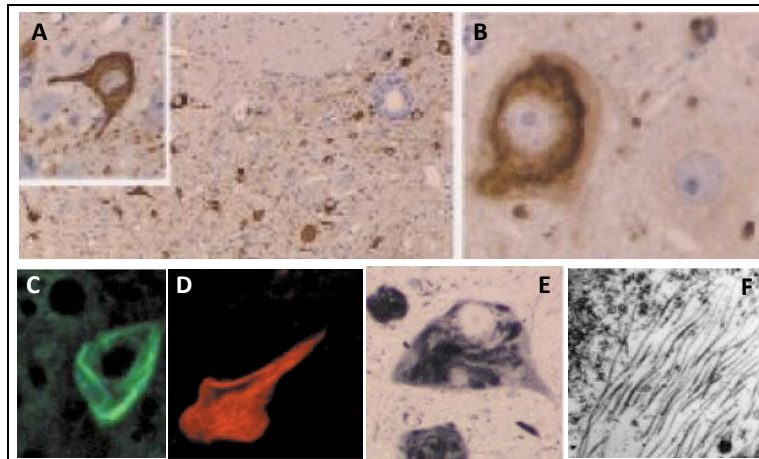


Figure 17 : La pathologie Tau dans un modèle murin de dégénérescenceneurofibrillaire basé sur la surexpression d'une protéine Tau mutée P301L (Lewis *et al.*, 2000):

(A-B) Marquage immunohistochimique des protéines Tau phosphorylées aux épitopes (A) AT8 (pS202-pT205) et (B) AT180 (pT231). (C-D) Marquage de neurones en dégénérescence par des intercalants de feuillets- β : Thioflavine S (C) et rouge congo (D). (E) Marquage de l'agrégation des protéines Tau par imprégnation argentique (technique du Gallyas). (F) Analyse en microscopie électronique à transmission des protéines Tau agrégées présentant des filaments analogues aux PHFs humains.

Depuis, d'autres travaux ont rapporté le développement et la caractérisation de modèles murins basés sur la surexpression de protéines Tau humaines comportant une ou plusieurs des différentes mutations DFTP-17 (G272V, N279K, P301S, V337M, R406W) ([Tableau 4, p.53](#)). Dans ces modèles, différents promoteurs d'expression et différentes isoformes de Tau ont été utilisés entraînant des localisations et des niveaux d'expression différents. Cependant, quel que soit le modèle on observera une pathologie Tau dont l'étendue sera fonction de la localisation et du niveau d'expression du transgène. De façon importante, il faut noter que la quasi-totalité des modèles murins Tau mutées, présentent une perte neuronale significative dans les zones d'expression de la protéine Tau mutée, et ceci par opposition aux modèles transgéniques APP et PS1 mutés qui modélisent la deuxième lésion de la MA. Ces résultats renforcent l'hypothèse que la pathologie Tau est un élément central dans la mort neuronale observée dans la MA et les Tauopathies (pour revue (McGowan *et al.*, 2006).

Lignée	Isoformes**	mutation	promoteur	Niveau d'exp° / nb de copies et génotype	localisation de l'expression	Début de la pathologie Tau	Phosphorylation de Tau et épitopes conformationnels	Mise en évidence des agrégats de Tau	troubles moteurs	Références	année
PS5 PS19	hTau 412	P301S	MoPrP	3-5x l'endogène (Hz)	Cerveau et Moelle Epinière	dès 3 mois	AT270, AT8, PHF1,	Gallyas, Congo red, Thioflavine S + et Tau insoluble	Dès 7 mois	(Yoshiyama <i>et al.</i> , 2007)	2007
TgTau ^{P301L}	hTau 441	P301L	Syrian Hamster PrP	ND (Hz)	Cerveau et Moelle Epinière	dès 10 mois	PHF1, AT8, CP27, TG3, Alz50, MC-1.	Gallyas, Bielschowsky, Thioflavine S +, MET	Absents	(Murakami <i>et al.</i> , 2006)	2006
rTg(tauP301L) 4510	hTau 383	P301L	Ca2+ calmodulin kinase II inducible	13x l'endogène (Hz)	Cortex, Hippocampe, Moelle épinière	dès 3 mois	AD2/PHF1, AT8, PG5, TG3, CP13. MC-1, Alz50.	Bielchowsky, Thioflavine S +, MET	dès 10 mois	(Ramsden <i>et al.</i> , 2005; Santacruz <i>et al.</i> , 2005; Spires <i>et al.</i> , 2006)	2005
Tau 4R/2N P301L	hTau 441	P301L	Thy1	4x l'endogène (Ho)	Cortex + Hippocampe + Moelle Epinière	dès 9 mois	AD2, AT180, AT8, AT270, AT100, AP422.	Thioflavine S +, Gallyas, MET Tau insoluble	dès 9 mois	(Terwel <i>et al.</i> , 2005)	2005
TgTauR406W	htau441	R406W	Syrian Hamster PrP	1,8x l'endogène	Cerveau et Moelle Epinière	dès 10 mois	PHF1, CP13, PS199, AT8, PT205, PT231, PS235, PS396, PS413, Alz50	Gallyas, MET	dès 10 mois*	(Ikeda <i>et al.</i> , 2005)	2005
SJLB9	hTau 383	N279K	MoPrP	1,5 à 1,6X l'endogène (Ho)	Cortex, Hippocampe, Striatum + + +, / Bulbe olfactif, diencéphale, cervelet + +, tronc + et Moelle épinière	ND	Très faible pour AT8 et AT180	Absence	NC	(Taniguchi <i>et al.</i> , 2005)	2005
RW 37	HTau 441	R406W	MoPrP	8-10x l'endogène(Ho)	Cerveau et Moelle Epinière	dès 12 mois	Diminution à AD2	Thioflavine S +, MET, Tau insoluble	OUI mais âge NC	(Zhang <i>et al.</i> , 2004)	2004
Tau R406W	htau441	R406W N-myc C-FLAG	Ca2+ calmodulin kinase II	0,2X Endogène (Hz)	Tronc + + + et Moelle Epinière +	dès 18 mois	(IHC) pS199, pS404, AT180, Alz50	Gallyas, Thioflavine S + et Congo Red, MET, Tau insoluble	Absents	(Egashira <i>et al.</i> , 2005; Tatebayashi <i>et al.</i> , 2002)	2002
P301S	hTau 383	P301S	Thy1.2 (Hz et Ho)	ND	Cerveau et Moelle Epinière	dès 5-6 mois (Ho) 12 mois (Hz)	AT270, AT8, pT212, CP3, AT180, 12E8, AD2, PG5, AT100, AP422	Thioflavine S +, MET	Dès 5-6 mois pour les (Ho) et 12-14 mois (Hz)	(Allen <i>et al.</i> , 2002; Bellucci <i>et al.</i> , 2004; Delobel <i>et al.</i> , 2006)	2002
Tg212-216	hTau 441	V337M N-myc C-FLAG	PDGF-β	5-10 copies et <10x l'endogène	Hippocampe + Cortex	dès 11 mois	AT8, pS199, ubiquitine et Alz50 (IHC)	Gallyas, Congo red, Thioflavine S +, MET Tau insoluble,.	ND	(Tanemura <i>et al.</i> , 2001; Tanemura <i>et al.</i> , 2002)	2001
Tg G272V	hTau 441	G272V	MoPrP Tet Off		Tronc +, cervelet +, Moelle Epinière + + +, neocortex et hippocampe +	pathologie faible	marquage AD2, TG3 (faibles), AT8 (faible)	Thioflavine S +, Tau insoluble	Absents	(Gotz <i>et al.</i> , 2001c)	2001
pR5-183	hTau 441	P301L	Thy1.2	0,7X l'endogène	Hippocampe, fornix, amygdale, cortex et Moelle Epinière + + +, Tronc, striatum, cervelet +.	dès 8 mois	(IHC) TG3, AT180, AD2/PHF1, AT8, AT100. MC-1, Alz50.	Gallyas, Thioflavine S +, MET, Tau insoluble	ND	(Gotz <i>et al.</i> , 2001a; Gotz <i>et al.</i> , 2001b)	2001
VLW	hTau 441	G272V/P301L/R406W	Thy1.2	1 à 2x l'endogène (Hz)	Cortex + Hippocampe (CA1 et CA3 uniquement) + + +, Striatum +, Moelle Epinière +,	ND	(IHC) AT8, AT180,	MET, Tau insoluble	Absents	(Lim <i>et al.</i> , 2001)	2001
JNPL3	hTau 383	P301L	MoPrP	1x l'endogène (Hz et Ho)	Cortex, Hippocampe, Hypothalamus, Thalamus, Tronc, cervelet et Moelle Epinière	dès 5-6 mois	AT8, AT180, AT270, pS262, pT231, pT212, pS422, CP9, CP13, PG5, PHF-1, TG3. Alz50, MC-1	Gallyas, Biecholwski, Bodian, Thioflavine S +, Congo red, MET et Tau insoluble	Dès 4,5 mois (Ho) et 6,5 (Hz)	(Ho <i>et al.</i> , 2001; Lewis <i>et al.</i> , 2000; Sahara <i>et al.</i> , 2002; Zehr <i>et al.</i> , 2004)	2000

Tableau 4 : Les modèles murins de dégénérescenceneurofibrillaire et les principales caractéristiques de la dégénérescenceneurofibrillaire observées dans ces modèles :

L'analyse de la phosphorylation de Tau est étudiée dans la plupart des cas par biochimie et immunohistochimie, sauf quand il est précisé IHC où l'analyse a été réalisée uniquement par immunohistochimie. Les troubles moteurs correspondent à la présence d'une paralysie des pattes postérieures ou *à une mauvaise performance des souris dans des tests moteurs (Rotarod). Abréviations : MET : microscopie électronique à transmission pour la caractérisation ultra-structurale des filaments de Tau ; Ho et Hz : respectivement Homozygote et Hétérozygote. **nomenclature des isoformes utilisant le nombre d'acides aminés ([Figure 1, p.8](#)) NC/ND : non communiqué ou non déterminé.

Cependant, à ce jour, la nature de la mort neuronale impliquée est encore mal connue. En effet, l'apoptose semble contribuer très faiblement à la mort neuronale dans ces modèles (Allen *et al.*, 2002; Andorfer *et al.*, 2003; Gotz *et al.*, 2001a; Tanemura *et al.*, 2002) et renforce l'idée que la participation de l'apoptose dans la MA est encore controversée. De la même façon, l'observation de neurones en nécrose ou en autophagie a été également rapportée dans ces modèles, ce qui suggère que ces types de mort cellulaire pourraient également contribuer au processus dégénératif (Andorfer *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2001). Enfin, on peut noter que certains modèles récents ont été conçus de telle manière que l'expression des protéines Tau mutées soit inductible (Ramsden *et al.*, 2005; Santacruz *et al.*, 2005). Ces modèles seront d'une très grande utilité pour établir la chronologie des événements moléculaires depuis l'induction du transgène jusqu'à la DNF et la mort neuronale.

Cependant, il faut garder à l'esprit que la plupart de ces modèles présente également une atteinte de la moelle épinière associée à des troubles moteurs importants. Cette limite apparaît comme un handicap majeur pour l'analyse des paramètres cognitifs des souris par des tests comportementaux qui font intervenir, pour la plupart, les capacités motrices des souris. En conséquence, la recherche actuelle de nouveaux modèles se tourne vers le développement de souris transgéniques ne présentant pas ces troubles moteurs afin de pouvoir caractériser le phénotype comportemental et l'état mnésique de ces souris.

3.2.1.2 Les modèles cellulaires DFTP-17

A côté des modèles *in vivo*, pertinents d'un point de vue physiopathologique, de nombreux modèles cellulaires, basés également sur la surexpression de protéines Tau mutées (G272V N279K, ΔK280, P301L, S305N, V337M, R406W) ont été développés afin d'identifier les mécanismes d'action, par lesquels les mutations DFTP-17 pouvaient entraîner un comportement pathologique des protéines Tau. L'essentiel de ces études a été réalisé dans

des modèles hétérologues tels que l'ovocyte de Xénope (Delobel *et al.*, 2002b), des cellules CHO (Arawaka *et al.*, 1999; Dayanandan *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 1999; Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2000) des cellules COS (Dayanandan *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 2000b) ou des cellules humaines « non-neuronales » comme les fibroblastes (Lu and Kosik, 2001) ou des cellules de rein embryonnaire HEK-293 (Nagiec *et al.*, 2001). Seules quelques études ont été réalisées dans des modèles cellulaires humains de type neuronal (Dayanandan *et al.*, 1999; DeTure *et al.*, 2000; DeTure *et al.*, 2002b; Mack *et al.*, 2001). D'une façon générale, les mutations, dans ce contexte, vont avoir des effets différents suivant les mutations et variables d'un modèle cellulaire à l'autre (pour revue (Brandt *et al.*, 2005; Ko *et al.*, 2005). Ainsi, les mutations de Tau peuvent modifier sa capacité à lier les microtubules. En effet, l'analyse de la maturation de l'ovocyte de Xénope (dépendante de la dynamique microtubulaire), après injection de protéines Tau mutées dans l'ovocyte, montre que certaines mutations de Tau (R406W et S305N) augmentent sa capacité à lier les microtubules. Ces protéines Tau mutées pourront alors entrer en compétition avec les MAPs endogènes et bloquer la maturation ovocytaire. A l'inverse, d'autres mutations telles que les mutations G272V, Δ K280, P301L, P301S et V337M ne bloquent pas la maturation de l'ovocyte en raison de leur plus faible capacité à lier les microtubules (Delobel *et al.*, 2002b). Cet effet fonctionnel des mutations n'est pas aussi évident dans des cellules CHO où les protéines Tau mutées (mutations P301L, V337M et R406W) semblent lier aussi bien les microtubules que des protéines Tau sauvages, dans un contexte de simple surexpression (Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2000). Ces résultats contradictoires peuvent néanmoins être expliqués, en partie, par une étude de Lu et collaborateurs. En effet, par opposition aux études précédemment décrites, la co-expression d'une protéine Tau sauvage avec une protéine Tau mutée dans des fibroblastes montre que la protéine Tau sauvage est retrouvée préférentiellement au niveau de la fraction microtubulaire alors que la protéine Tau mutée se retrouve au niveau cytoplasmique. Ces résultats suggèrent ainsi que la différence de capacité de liaison entre des protéines Tau mutées et des protéines Tau sauvages, ne peut être mise en évidence que lorsque celles-ci sont exprimées à des niveaux équivalents dans un même modèle cellulaire (compétition équitable) (Lu and Kosik, 2001).

Dans ces différents modèles cellulaires, les mutations étudiées n'entraînent pas d'augmentation de l'état de phosphorylation de Tau et de façon inattendue, elles mènent plutôt à une diminution de la phosphorylation de Tau aux épitopes AT8 (pS202-pT205 ou pS199-pS202), Tau-1 (pS195, pS198, pS199, pS202), AT180 (pT231) et AD2/PHF-1 (pS396-pS404) (Arawaka *et al.*, 1999; Dayanandan *et al.*, 1999; DeTure *et al.*, 2002a; Mack *et al.*,

2001; Matsumura *et al.*, 1999). Enfin, à ce jour, même si les mutations semblent être suffisantes dans certains modèles cellulaires pour entraîner une augmentation de l'insolubilité de Tau et mener à la formation de structures s'apparentant à des points d'initiation de l'agrégation (DeTure *et al.*, 2002a; Ferrari *et al.*, 2003), elles apparaissent insuffisantes pour mener à la formation de filaments de Tau identiques aux PHFs observés dans la MA (pour revue (Ko *et al.*, 2005).

En conclusion, ces modèles basés sur des mutations DFTP-17 et, plus particulièrement, les modèles murins seront des outils indispensables pour l'étude des mécanismes mis en jeu au cours de la DNF. Cependant, à ce jour, aucune mutation de Tau n'a été associée à la MA. Ainsi, d'autres travaux se sont orientés vers l'établissement de modèles plus pertinents vis-à-vis de la physiopathologie des protéines Tau de la MA. Pour répondre à cet objectif, des modèles murins, basés sur la surexpression de protéines Tau sauvages et/ou la surexpression de kinases majoritairement impliquées dans la dérégulation de l'état de la phosphorylation de Tau, ont été développés.

3.2.2 Les modèles Tau sauvages

3.2.2.1 Les modèles de surexpression

Historiquement, les premiers modèles murins développés surexpriment soit l'isoforme la plus courte de Tau sauvage (2^310^-) (Brion *et al.*, 1999; Ishihara *et al.*, 1999) soit l'isoforme la plus longue (2^310^+) (Gotz *et al.*, 1995; Probst *et al.*, 2000 ; Spittaels *et al.*, 1999; Terwel *et al.*, 2002). Dans ces modèles, on observe une pathologie axonale qui atteint la moelle épinière. Cette axonopathie, liée à la surexpression de Tau au niveau de cette région, mène à une dégénérescence Wallérienne avec la présence de dilatations axonales et une démyélinisation progressive des axones des motoneurones. Cette dégénérescence entraînera une atrophie musculaire (par désafférentation des motoneurones) responsable des troubles moteurs importants observés dans ces modèles et font de ces derniers des outils intéressants pour l'étude des Tauopathies touchant la moelle épinière, telle que la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA).

Cependant, ces souris ne développent pas l'ensemble des caractéristiques de la DNF. En effet, on observe, le plus souvent dans ces modèles, une relocalisation somato-dendritique de la protéine Tau phosphorylée. Dans certains cas, la protéine Tau peut également montrer des changements de conformation spécifiques aux protéines Tau pathologiques et détectés par les anticorps Alz50 et MC-1 (Brion *et al.*, 1999; Ishihara *et al.*, 1999; Spittaels *et al.*, 1999) ainsi qu'une augmentation de l'insolubilité de Tau (Ishihara *et al.*, 1999; Probst *et al.*, 2000). Cependant, dans ces modèles, les protéines Tau ne s'agrègent pas, ou peu et uniquement chez des souris âgées (Ishihara *et al.*, 2001). Ces données suggèrent que ces modèles ne présentent qu'une phase précoce dans la chronologie de la DNF.

En revanche, il est important de noter que l'expression d'un minigène de Tau humain, aboutissant à l'expression des 6 isoformes de protéines Tau humaine, entraîne une DNF uniquement dans un contexte d'inactivation de la protéine Tau murine (souris KO Tau) (Andorfer *et al.*, 2003; Duff *et al.*, 2000). Cette observation soulève ainsi le fait que la protéine Tau murine pourrait interférer avec la protéine Tau exogène au cours de la DNF observée dans les modèles murins. Enfin, ce résultat, pourrait également apporter des éléments de réponse pour expliquer l'absence de pathologie Tau, dans les modèles « Tau sauvage » décrits précédemment, où la surexpression de protéine Tau exogène été concomitante à une expression endogène de protéine Tau murine.

3.2.2.2 Les modèles d'hyperphosphorylation de Tau sauvage

Comme il a été décrit précédemment, la dérégulation de la phosphorylation de la protéine Tau constitue la caractéristique majeure des protéines Tau agrégées. Comme cette phosphorylation a été décrite comme un facteur favorisant de l'agrégation des protéines Tau *in vitro* (Alonso *et al.*, 2001), un certain nombre d'études se sont intéressées à l'effet de la surexpression, dans des modèles murins, de kinases impliquées dans la dérégulation de la phosphorylation de Tau. Parmi ces kinases, GSK3- β et Cdk5 ont été majoritairement étudiées et ont donné lieu au développement de plusieurs souris transgéniques.

Ainsi, la surexpression de la GSK3- β seule mène à une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau endogène aux épitopes reconnus par les anticorps AT8, PHF-1/AD2 et AT180 (Brownlee *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 2001; Spittaels *et al.*, 2000) et à une relocalisation somato-dendritique des protéines Tau phosphorylées. Une mort neuronale de type apoptotique (Lucas *et al.*, 2001) ainsi que des troubles d'apprentissage dans des tâches de mémorisation spatiale ont été également observés dans ces modèles (Hernandez *et al.*, 2002). Cependant, à ce jour, aucun de ces modèles ne présente les caractéristiques d'une fibrillogénèse de Tau.

A côté de ces modèles GSK3- β seule, la surexpression de la GSK3- β dans un modèle de DNF, basé sur une triple mutation de Tau (G272V, P301L, R406W), potentialise la pathologie Tau en entraînant la formation accélérée d'agrégats de protéines Tau (Engel *et al.*, 2006c). A l'inverse, l'inhibition de la GSK3- β par le chlorure de lithium (LiCl), un inhibiteur sélectif, ou l'arrêt de l'expression de GSK3- β dans des modèles d'expression inductible prévient l'hyperphosphorylation de Tau (Engel *et al.*, 2006a; Perez *et al.*, 2003), la formation d'agrégats et la neurodégénérescence (Engel *et al.*, 2006b; Noble *et al.*, 2005).

La deuxième kinase majoritairement exploitée pour le développement de modèles murins est la kinase Cdk5. Cette kinase neuronale, décrite précédemment, présente une activité dérégulée dans des situations pathologiques par le biais de son interaction avec la protéine p25. Le développement de modèles murins s'est donc orienté vers la surexpression de la protéine p25. Ainsi, la surexpression de p25 mène à une augmentation de l'état de phosphorylation de Tau (Ahlijanian *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2003; Plattner *et al.*, 2006). Cependant, alors qu'une étude montre une agrégation des protéines Tau sous la forme de feuillets β -plissés (Cruz *et al.*, 2003), cette agrégation de Tau n'est pas toujours retrouvée dans

des modèles équivalents (Ahlijanian *et al.*, 2000; Bian *et al.*, 2002; Plattner *et al.*, 2006). On peut noter également que l'augmentation de l'activité de Cdk5 semble également participer à la perte neuronale (Cruz *et al.*, 2003) et pourrait conduire à une dégénérescence de type Wallérienne (Bian *et al.*, 2002). Enfin, la surexpression de p25 dans un modèle de DNF, basé sur la surexpression de la protéine Tau mutée P301L, montre une potentialisation de la pathologie neurofibrillaire en comparaison avec les souris Tau mutées seules (Noble *et al.*, 2003).

L'ensemble de ces données *in vivo* suggère que la phosphorylation pourrait agir comme un catalyseur de l'agrégation de Tau et/ou être impliquée dans l'initiation de l'agrégation de la protéine Tau (Cruz *et al.*, 2003). Cette hypothèse est également appuyée par l'observation d'amas ponctiformes de protéines Tau phosphorylées après l'expression, dans un modèle murin, d'un dominant négatif de la sous unité catalytique de la phosphatase PP2A menant à une réduction de 33% de son activité phosphatasique (Kins *et al.*, 2001). De la même façon chez des souris transgéniques, l'inactivation du gène codant pour la protéine Pin1, une isomérase facilitant la déphosphorylation de Tau par PP2A, conduit à un phénotype proche de la DNF (Liou *et al.*, 2003). A côté de ces modèles *in vivo*, l'inhibition pharmacologique de PP2A, dans les modèles cellulaires, par des traitements à l'acide okadaïque est connue pour mener également à l'hyperphosphorylation et à la phosphorylation anormale de Tau (Bussiere *et al.*, 1999; Caillet-Boudin and Delacourte, 1996; Mailliot *et al.*, 1998). Cependant, dans ces modèles cellulaires, aucune structure apparentée aux PHFs n'a été détectée. Ces données font supposer que la phosphorylation à elle seule n'est pas suffisante pour mener à une agrégation des protéines Tau et que d'autres événements ou d'autres modifications de Tau telles que l'oxydation pourraient concourir à la formation des agrégats de Tau. En effet, il a été montré que le co-traitement pharmacologique de neuroblastomes par un inhibiteur de PP2A et un dérivé de la peroxydation des lipides appelé HNE pour 4-Hydroxy-2-nonéal mènerait à un changement de conformation de Tau, détecté par l'anticorps Alz50 (Takeda *et al.*, 2000), et la formation de filaments de Tau (Perez *et al.*, 2000a).

En conclusion, les travaux de recherche récents ont conduit à l'élaboration de nombreux modèles d'études présentant un certain nombre des caractéristiques de la dégénérescenceneurofibrillaire. Cependant, même si à ce jour, la phosphorylation semble être impliquée de façon importante dans ce processus, son rôle exact reste encore à préciser. De plus l'analyse de ces modèles suggère que d'autres mécanismes pourraient être impliqués dans la cascade délétère menant à la dégénérescenceneurofibrillaire. Ainsi, la compréhension du rôle de la phosphorylation et de la chronologie des mécanismes moléculaires impliqués dans cette mort neuronale associée à la dysfonction des protéines Tau reste actuellement un point crucial à élucider avant le développement de stratégies thérapeutiques pertinentes pour les Tauopathies et la Maladie d'Alzheimer.

Résultats

Résultats

Objectifs de l'étude

Notre laboratoire s'intéresse depuis une vingtaine d'années à l'étude des protéines Tau et à leurs modifications dans la DNF. En effet, la relation de causalité entre la progression de la DNF et les signes cliniques observés dans la MA ainsi que le caractère agrégatif de Tau, commun à un grand nombre de maladies neurodégénératives, place cette lésion à un point stratégique dans la cascade des événements qui mènent à la mort neuronale dans ces maladies neurodégénératives.

Mon travail de thèse s'inscrit, donc, dans le contexte scientifique de l'étude des mécanismes moléculaires qui conduisent à la mort neuronale observée dans la maladie d'Alzheimer. En effet, si l'on sait que la dérégulation de la phosphorylation de Tau est un élément au cœur du processus dégénératif, la question de savoir si l'hyperphosphorylation et/ou la phosphorylation anormale de Tau, à elles seules sont responsables, de l'agrégation de Tau et de la mort neuronale reste encore à déterminer. De façon plus générale, le débat reste encore ouvert sur les mécanismes impliqués dans la mort neuronale dans ces maladies neurodégénératives et en particulier sur la nature des formes de Tau impliquées dans la neurodégénérescence.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans cette mort neuronale liée à Tau et à étudier la signification et le rôle de la dérégulation de la phosphorylation de Tau dans son agrégation et dans la mort neuronale. Pour répondre à cet objectif, nous devons au préalable disposer de modèles d'études pertinents. Aussi, ce travail a permis le développement et la caractérisation de plusieurs modèles visant à 1) moduler la phosphorylation de Tau ou à 2) potentialiser le caractère agrégatif de Tau par l'utilisation de mutations de Tau connues chez l'homme pour conduire à son agrégation.

1 Développement et caractérisation d'un modèle murin de dégénérescenceneurofibrillaire.

1.1 Objectifs

Si la découverte de la protéine Tau comme constituant principal des PHFs a été publiée en 1985 (Brion, 1985), l'absence de modèles d'études a longtemps été un frein à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la DNF. En effet, la simple surexpression de protéines Tau sauvages dans des souris transgéniques n'est pas suffisante pour obtenir les marqueurs de la DNF (Brion *et al.*, 1999; Ishihara *et al.*, 1999; Kampers *et al.*, 1999). Avec la découverte de mutations dans le gène de Tau, connues pour mener à l'agrégation de Tau chez l'homme (Hutton *et al.*, 1998; Poorkaj *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998), la modélisation de la DNF chez les souris a pu être envisagée (Gotz *et al.*, 2001a; Lewis *et al.*, 2000). Depuis la création de ces deux premiers modèles, un nombre important de modèles murins ([Tableau 4, p.53](#)) basés sur des mutations pathologiques de Tau ont été développés. Cependant, au début de notre étude, aucun de ces modèles ne récapitulait complètement l'ensemble des marqueurs caractéristiques de la pathologie Tau observée dans la MA (cf. [§3.2.1.1, p.50](#) ; [Tableau 4, p.53](#)). De plus, ces modèles présentaient des troubles moteurs, handicap majeur à l'investigation des capacités mnésiques de ces souris à l'aide des tests comportementaux usuels.

Notre laboratoire a donc initié le développement d'un nouveau modèle de souris transgénique, basé sur une double mutation DFTP-17 P301S/G272V, qui récapitulerait l'ensemble des marqueurs de la DNF sans présenter les troubles moteurs classiquement décrits. Suite à la transgénèse, deux fondateurs ont été sélectionnés pour établir deux lignées de souris transgéniques différentes et respectivement dénommées Thy-Tau30 et Thy-Tau22. Ces deux lignées présentent des phénotypes différents en raison d'une différence dans la localisation d'expression du transgène.

Au cours de ma thèse, j'ai été impliqué dans l'étude de la pathologie Tau dans ces deux lignées et contribué à la caractérisation de ces modèles. Ces deux modèles présentant des caractéristiques phénotypiques différentes, seules les données obtenues dans la lignée Thy-Tau22, la lignée la plus proche d'un modèle de dysfonction de Tau centrée sur la région hippocampique, seront présentées de façon détaillée dans ce document. Les résultats

concernant la lignée Thy-Tau30, un modèle qui se rapproche de certains modèles précédemment décrits et permettant l'étude des Tauopathies atteignant la moelle épinière, sont, en revanche, joints en annexe ([Annexe 3, p.135](#)) et seront succinctement comparées avec la lignée Thy-Tau22 dans les conclusions de ce travail.

1.2 Résultats

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

Katharina Schindowski, Alexis Bretteville, Karelle Leroy, Séverine Bégard, Jean-Pierre Brion, Malika Hamdane and Luc Buée (2006). **Alzheimer's disease-like Tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated Tau transgenic mouse without any motor deficits.** *Am J Pathol* 169, 599-616.

Neurobiology

Alzheimer's Disease-Like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficits and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits

Katharina Schindowski,^{*†} Alexis Bretteville,^{*†}
Karelle Leroy,[‡] Séverine Bégard,^{*†}
Jean-Pierre Brion,[‡] Malika Hamdane,^{*†} and
Luc Buée^{*†}

From INSERM U815,^{*} Lille, France; the Faculté de Médecine,[†]
Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique,
Université Lille 2, Lille, France; and the Laboratory of Histology
and Neuropathology,[‡] Free University of Brussels, School of
Medicine, Brussels, Belgium

Tau transgenic mice are valuable models to investigate the role of tau protein in Alzheimer's disease and other tauopathies. However, motor dysfunction and dystonic posture interfering with behavioral testing are the most common undesirable effects of tau transgenic mice. Therefore, we have generated a novel mouse model (THY-Tau22) that expresses human 4-repeat tau mutated at sites G272V and P301S under a Thy1.2-promotor, displaying tau pathology in the absence of any motor dysfunction. THY-Tau22 shows hyperphosphorylation of tau on several Alzheimer's disease-relevant tau epitopes (AT8, AT100, AT180, AT270, 12E8, tau-pSer396, and AP422), neurofibrillary tangle-like inclusions (Gallyas and MC1-positive) with rare ghost tangles and PHF-like filaments, as well as mild astrogliosis. These mice also display deficits in hippocampal synaptic transmission and impaired behavior characterized by increased anxiety, delayed learning from 3 months, and reduced spatial memory at 10 months. There are no signs of motor deficits or changes in motor activity at any age investigated. This mouse model therefore displays the main features of tau pathology and several of the pathophysiological disturbances observed during neurofibrillary degeneration. This model will serve as an experimental tool in future studies to investigate mechanisms underlying cognitive deficits during pathogenic tau aggregation. (*Am J Pathol* 2006, 169:599–616; DOI: 10.2353/ajpath.2006.060002)

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia in the elderly and is characterized neuropathologically by the presence of intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) and senile plaques in the brain and by a major loss of synaptic connections. NFTs are neuronal inclusions of the microtubule-associated tau protein and are composed of aggregated phosphorylated tau. In AD, NFTs occur in the hippocampus, the entorhinal and polymodal association cortices, and in the basal forebrain. These brain areas are also severely affected by neuronal and synaptic loss. The loss of neurites, synapses, and neurons represent one of the reasons for the cognitive deficits and dementia of AD.^{1–4}

In addition to the neuropathological hallmarks of AD, there are also a number of other pathophysiological disturbances that are observed in AD brain including the inflammatory reaction of glial cells (gliosis).⁵ It is now increasingly recognized that synaptic dysfunction is a major pathophysiological feature of AD. It has been suggested that disruption of neuronal communication is an early event in the disease progression and could occur independently of neuronal loss per se.⁶

Supported by the Centre National de la Recherche Scientifique; the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau; Gis-Longévité; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; the European Community (an integrated project for abnormal proteins in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, LSHM-CT-2003-503330 and a Marie Curie Fellowship K.S.); the Association d'Etudes et de Recherche sur la Maladie d'Alzheimer; the International Alzheimer Research Foundation (to J.P.B.); and the Région Nord/Pas-de-Calais and Centre Hospitalier Régional Universitaire-Lille (scholarship to A.B.).

A.B. and K.L. contributed equally to this study.

Accepted for publication April 27, 2006.

Mice for this study were generated in collaboration with Günter Tremp and Nathalie Touchet from Sanofi-Aventis, Vitry-sur-Seine, France.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Address reprint requests to Katharina Schindowski, INSERM U815, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France. E-mail: katharina.schindowski@lille.inserm.fr.

Table 1. Antibodies and Lectin Used in This Study

Antibody	Species	Specificity	Dilution	Source
AT8	Mouse	Tau; pSer202/pThr205	1:400 (WB); 1:10,000 (ICH/IF)	Innogenetics (Gent, Belgium)
pSer396	Rabbit	Tau; pSer396	1:5000	Biosource (Camarillo, CA)
AT180	Mouse	Tau; pThr231	1:500	Innogenetics
AT270	Mouse	Tau; pThr181	1:4000 (WB); 1:2000 (IHC)	Innogenetics
AP422/988	Mouse	Tau; pSer422	1:5000	Bussiere et al ⁶¹
AT100	Mouse	Tau; pThr212/pSer214	1:1000 (WB); 1:2000 (IHC)	Innogenetics
M19G	Rabbit	Tau; human-specific, 1 to 19 amino acids	1:20,000	Bussiere et al ⁶¹
MC1	Mouse	Tau; conformational epitope, 7 to 9 and 326 to 330 amino acids	1:1000	P. Davies
PHF-1	Mouse	Tau; pSer396/pSer404	1:50,000	P. Davies
Tau-5	Mouse	Tau; human/mouse-specific	1:10,000	Biosource
TP20	Rabbit	Tau; human-specific, 33 to 41 amino acids	1:2000	Brion et al ¹⁵
12E8	Mouse	Tau; pSer262	1:400	Seubert et al ⁶²
GFAP	Rabbit	GFAP	1:20,000 (IF)	DAKO (Trappes, France)
Synaptophysin	Rabbit	Synaptophysin	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
Synaptotagmin	Rabbit	Synaptotagmin I	1:1000	Synaptic System (Göttingen, Germany)
Lectin		Specificity	Dilution	Source
Biotinylated tomato lectin (<i>Lycopersicon esculentum</i>)		Microglia	6 µg/ml	Sigma-Aldrich L-0651 (Sigma-Aldrich, Lyon, France)

Tau transgenic (Tg) and gene-targeted mice are valuable models that reproduce various aspects of tauopathies and AD tau pathology with associated cognitive changes. Several models with single tau mutations, including P301L,⁷⁻⁹ P301S,¹⁰ G272V,¹¹ V337M,¹² and R406W,^{13,14} or overexpression of human tau isoforms¹⁵⁻¹⁷ have been generated. However, none of these mouse models fully recapitulates the neuropathological spectrum of tangle pathology observed in AD. Moreover, most published models show motor deficits and hind limb paralysis with increasing pathology caused by tau expression in the spinal cord. Motor dysfunction makes it very difficult to study these animals with behavioral experiments or in the late stages of tau pathology because they usually die earlier. Therefore, our aim was to generate a new tau mouse model without APP pathology that does not display any motor dysfunction to investigate the pure pathogenic tau accumulation and its effects in AD tau pathology. In the present study, we describe the construction and characterization of a mouse model expressing double-mutated human tau that displays several of the key features of tau pathology and other pathological changes, such as loss of synaptic function and impaired behavior, observed in AD and other types of tauopathies.

Materials and Methods

Generation of Tg Mice Expressing G272V and P301S Human Tau

The cDNA of the 412 amino acid 4-repeat isoform of human tau (htau 46, cloned from human brain cDNA)

was a kind gift from M. Goedert (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK).¹⁸ To introduce a Kozak-sequence and *Xho*I site, the cDNA was reamplified with the following primers: Tau5'tg 5'-CTCGAGGATGGCTGAGCCCCGCCAGG-3' and Tau3'tg 5'-CTCGAGTCACAAACCCTGCTTGGC-CAGGGAGG-3' and mutated at G272V and P301S (numbering according to the longest human tau isoform) by polymerase chain reaction (PCR)-based site-directed mutagenesis (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). This cDNA-construct was inserted into the *Xho*I-sites of a Thy1.2 expression vector.^{19,20} The Thy1.2 promoter specifically drives expression in neurons¹⁹ that starts at postnatal day 6²¹ and therefore does not directly affect embryonic development. The vector was then microinjected into a C57BL6/CBA background and backcrossed to C57BL6 for more than five generations. Tg mice were screened for the Tau transgene by PCR analysis of DNA prepared from tail biopsies (DNeasy tissues kit; Qiagen, Courtaboeuf, France). The forward (5'-ATGGCTGAGC-CCCGCCAGGAG-3') and the reverse (5'-TGGAGGT-TCACAGAGCTGGG-3') primers were used to amplify a 250-bp fragment of Tau DNA. The number of integrated copies was determined by Southern blot analysis.

All Tg mice used in the present study were heterozygous. Non-Tg littermates were used as wild-type (WT) controls for all experiments. The chosen line (THY-Tau22) is fertile with normal frequency and size of litters and stably transmits the transgene to its offspring. All experiments on animals were performed in compliance with, and following the approval of, the Centre National de la Recherche Scientifique-Institute of Laboratory Animal

Resources Committee, in accordance with standards for the care and use of laboratory animals and with French and European Community rules.

Western Blot Analysis

Whole brains were dissected by separating the cortex from the hippocampus and thalamus. Cortical and hippocampal preparations were homogenized in cell-lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) using several strokes of sonification and then boiled at 100°C for 10 minutes. For Western analysis, 10 or 25 μg of total protein were resolved on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, blotted onto nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes (all from Invitrogen), incubated with appropriate antibodies (Table 1), and developed using the ECL chemiluminescence kit (Amersham/GE Healthcare, Orsay, France). Protein levels were visualized and quantified using an imaging system (LAS-3000 2.0; Fuji Photo Film Co. Ltd.). Human brain samples were from the Association d'Etudes et de Recherche sur la Maladie d'Alzheimer brain bank.²²

Histology

Immunohistochemistry and Immunofluorescence

Tg and WT mice from 3 to 17 months were anesthetized and transcardially perfused sequentially with 0.9% NaCl and 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4) or 10% formalin and 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L PBS (pH 7.4). Brains and spinal cords were removed and stored in 4% paraformaldehyde. Some samples were embedded in paraffin and cut on a sliding microtome at a thickness of 10 μm . Cryosections (14 μm) were cut on a cryostat and mounted on chrome alum-coated slides. Endogenous peroxidase was quenched by treating the section with methanol containing 0.3% H_2O_2 for 30 minutes. Sections were blocked in 10% horse serum. Primary antibodies were used according to Table 1 and incubated overnight at 4°C in the presence of 1% horse serum. All secondary biotinylated or fluorescein-, Texas Red-, and AMCA-coupled antibodies, fluorochromes, ABC-kit, and 3,3'-diaminobenzidine as chromogen for peroxidase activity were from Vector Laboratories, Burlingame, CA. Incubation with the secondary antibody was done at room temperature for 1 hour. All washing steps (3 \times 10 minutes) and antibody dilution were done using phosphate-buffered saline (0.1 mol/L PBS, pH 7.4) or Tris-buffered saline (0.01 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4). Incubation with the ABC complex and detection with 3,3'-diaminobenzidine was done according to the manufacturer's manual. Hematoxylin counterstaining was performed according to standard procedures. A minimum of three mice per genotype, age, and sex was used for each determination. Data were analyzed by analysis of variance with Bonferroni's post test.

Gallyas Silver Impregnation

Floating cryosections (14 μm) were silver stained according to Braak and Braak.²³

4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) Staining

Cryosections were mounted in VectaShield containing DAPI (Vector Laboratories).

Nissl/Cresylviolet Staining

Mounted cryosections (14 μm) were rinsed 5 minutes in distilled water and transferred to a 1.5% cresyl-violet solution. Sections were then incubated in a solution containing 1% glacial acetic acid and 16% ethanol in distilled water. Sections were then transferred to an ascending alcohol series (70%, 90%, 96%, and 99% ethanol), and finally to toluene, before they were coverslipped using VectaMount (Vector Laboratories).

Semiquantitative Estimation of Cell Density

Images were made using a software-controlled (Leica FW 4000; Leica, Rueil-Malmaison, France) digital camera (Leica DC 300FX) attached to a microscope (Leica DM RB), stored onto hard disk, and analyzed offline. For analysis, images were taken using a $\times 40$ objective. In each image, stained cells were counted in a counting frame.

Transmission Electron Microscopy

Tg and WT mice were anesthetized with chloral hydrate and perfused intracardially with a solution of 2% (w/v) paraformaldehyde and 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 7.4.¹⁵ Tissue blocks were quickly dissected and further fixed by immersion with 4% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 7.4 for 90 minutes. After washing in Millonig's buffer with 0.5% (w/v) sucrose for 24 hours, the tissue sections were postfixated in 2% (w/v) OsO_4 for 30 minutes, dehydrated, and embedded in Epon. Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Zeiss EM 809 transmission electron microscope at 80 kV. Measurements of the diameter of filaments were performed on digitalized images using the public domain NIH ImageJ program and given in mean \pm SD.

Electrophysiological Recordings

Hippocampal slices (400 μm thick) were prepared from male tau Tgs and WT controls at 6 to 7 and 14 to 15 months of age. Slices were cut transversally on a McIlwain tissue chopper (Campden Instruments, Loughborough, UK) and placed in a submersion-type recording chamber through which artificial cerebrospinal fluid (ACSF: 124 mmol/L NaCl, 3 mmol/L KCl, 1.25 mmol/L NaH_2PO_4 , 1.3 mmol/L MgSO_4 , 2 mmol/L CaCl_2 , 26 mmol/L NaHCO_3 , and 10 mmol/L glucose) was continu-

ously superfused at 2.5 to 3 ml/minute. The ACSF was bubbled with a mixture of 95% O₂ and 5% CO₂ and maintained at 30°C. Test stimulations (0.1 ms in duration) were delivered at constant intensity every 30 seconds through bipolar stainless steel electrodes placed in the stratum radiatum of the CA1 area. Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) were recorded with a monopolar tungsten electrode implanted in the same region. To analyze synaptic transmission efficiency, input/output plots were constructed individually for each slice by applying single stimuli in increments of 20 μ A from 100 μ A (threshold) to 300 μ A. To evaluate synaptic plasticity, a 30-minute baseline was recorded with the stimulation intensity set at half-maximal strength. Long-term potentiation (LTP) was induced by applying a single train of tetanic stimulation at a frequency of 100 Hz for 1 second, after which the size of the EPSP was monitored for 90 minutes.

Behavioral Tests

Modified Irwin Examination

A comprehensive screen, modified from Irwin,²⁴ was used to determine whether any of the mice exhibited physiological, behavioral, or sensorimotor impairments related to their genotype. To explore motor skills, coordination, and muscle strength, the mice were placed on a wire that was tightened between two 30-cm-high columns and their ability to balance on the wire was assessed. In addition, their ability to grasp and hang on the wire with all four paws for at least 5 seconds and to climb back on the wire was determined.

Rotarod Test

Motor coordination and balance were tested using an accelerating rotarod (Rota-ROD LE 8200, Bioseb, Chaville, France). The mice were allowed to explore the rotarod for 2 minutes without rotation and then the drum was slowly accelerated to 14 rotations per minute (rpm). The mice were subjected to 2-minute training trials twice a day for 2 consecutive days. On day 3 the rotarod test was performed by placing the mice on the rotating drum (25 rpm) for 2 minutes and the time each animal was able to maintain its balance walking on top of the rod was measured. Data were analyzed by Student's *t*-test.

Elevated Plus Maze

The elevated plus maze is a test of anxiety and motor behavior. The maze was set at a height of 65 cm and consisted of four white Plexiglas arms, each 6 cm wide and 28 cm long with 10-cm-high gray walls surrounding the two enclosed arms. Individual mice were placed in the center of the maze facing an open arm and the total distance and time spent in each arm was measured by a video camera connected to a computer and analyzed with the Videotrack Software (View Point S.A., Champagne au Mont d'Or, France). The total time spent in

open and closed arms, the number of arm entries, and the inactive time were calculated. Data were analyzed by unpaired Student's *t*-tests.

Spatial Learning and Memory in the Morris Water Maze (MWM)

This experiment was performed in a circular pool, 90 cm in diameter, made of white plastic and filled with milky colored water. An escape platform, 8 cm in diameter, made of clear plastic was submerged 0.5 cm under the water level. Visual clues were provided by different geometrical forms printed in A4-sized letters and placed on the four surrounding walls (distance from the pool was ~50 to 70 cm). Each mouse was given four trials daily (5- to 7-minute interval between trials, a total of 16 trials) for 4 days. Each trial was performed from one of four different starting points. The movement of the mice was monitored using Videotrack Software (View Point). The time taken to locate the escape platform (escape latency; up to 60 seconds) was determined. After locating the platform the mouse was allowed to sit on it for 15 seconds. Mice who failed to find the platform within 60 seconds were guided to it and allowed to stay on it for 15 seconds. A latency of 60 seconds was entered into the record for such an occurrence. All four trials per day were averaged for statistical analysis, except for the first trial on day 1. On day 9 (5 days after the last training) mice were subjected to a 60-second probe trial in which the platform was removed and the mice were allowed to search for it. The time that each animal spent in each quadrant was recorded (quadrant search time). Four groups of male mice were used at 2 to 3, 7, 10, and 14 months. The 7-month-old Tg and WT mice showed severe freezing behavior (eg, lying motionless in the water and refusing to swim) that strongly interfered with the test and were excluded from the data analysis. All behavioral tests were conducted under a quiet and light-reduced environment. Data were analyzed by Student's *t*-tests.

Results

Generation and Selection of THY-Tau Tg Mice

The tau mutations G272V and P301S were generated by site-directed mutagenesis PCR into the human 4-repeat tau cDNA and subcloned into the Thy1.2-expression vector (Figure 1A). After microinjection and implantation, eight viable THY-Tau mouse lines were obtained. A variable number of DNA copies were detected in each of the lines from 1 copy up to 10 copies (Figure 1B). Human tau protein expression in the heterozygous animals from all lines was analyzed in the cortex, hippocampus-enriched fractions, and spinal cord. Five lines expressed low levels of human tau in mouse brain and were excluded. One important aim of this study was to generate a tau Tg mouse line with tau pathology similar to that observed in AD in the absence of any motor dysfunction. Therefore, expression of tau protein in the spinal cord, accompanied by motor deficits and paralysis, was an exclusion criterion for each line. Because

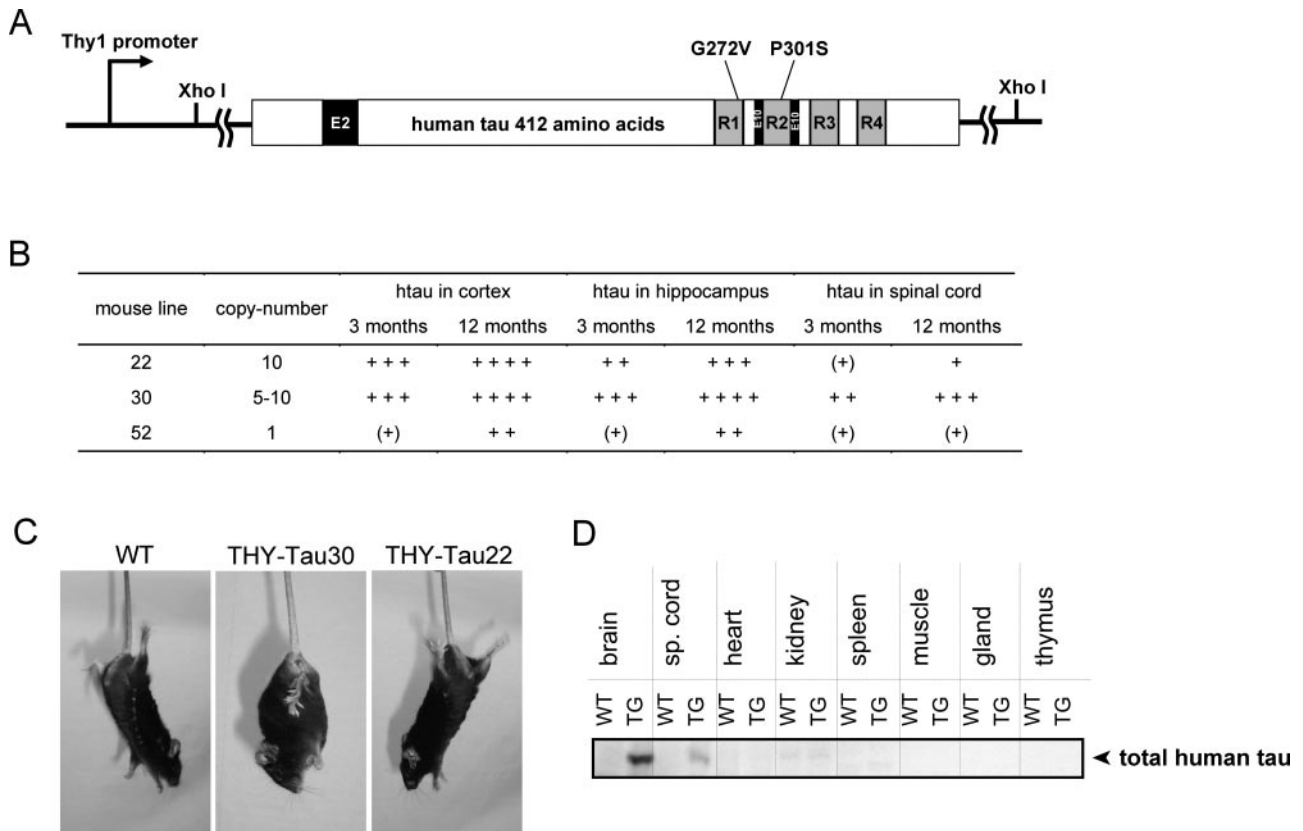


Figure 1. Generation of the THY-Tau Tg mouse model. **A:** The human 412 amino acid double-mutated *tau* construct used for microinjection. Exons 2 and 10 are depicted by black boxes and microtubule binding repeats by gray-shaded boxes. The human 4-repeat *tau* was site-directed mutated at G272V and P301S and cloned as *Xho*I-fragment into a Thy1.2-expression vector. **B:** THY-Tau mouse lines, transgene DNA copy number, and relative protein levels of total human tau in cortex, hippocampus, and spinal cord compared to endogenous tau in WT from three adult animals at 3 and 12 months: (+), traces; +, low levels (similar to endogenous tau); ++, medium levels (twofold to threefold greater than endogenous tau); +++, high levels (fourfold to fivefold greater than endogenous tau); +++++, very high levels (fivefold to sixfold greater than endogenous tau; detection with M19G and tau-5). **C:** Positive grasping reflex in response to tail hang in a 10-month-old tau Tg mouse of line 30 (THY-Tau30) with hind limb paralysis. Mice from line 22 (THY-Tau22) and WT at the same age do not display this reflex. **D:** Expression of the transgene in different tissues from THY-Tau22. Immunoreactivity for tau-5 (total tau) is only found in the brain and minor traces in spinal cord. Representative immunoblot from a 6-month-old male THY-Tau22 (Tg) and WT.

mice from line 30 show rather high levels of human tau in spinal cord and starting by the age of 7 to 8 months they display dystonic posture and paralyzed hind limbs (Figure 1, B and C), the line was excluded. Nevertheless, the tau profile in the brain of line 30 is still quite interesting with high levels in hippocampus and rather low levels in the cortex. The tau pathology of line 30 is currently under investigation. Line 52 expresses low levels of the tau construct in hippocampus and cortex and develops tau accumulation at more than 18 months of age. Homozygous animals of line 52 are viable and their characterization is also currently being investigated.

By contrast, line 22 showed high levels of human tau protein in brain homogenates, only minor traces in the spinal cord (Figure 1D), and no dystonic hind limbs (Figure 1C) in all ages investigated (up to 18 months) and was therefore chosen as the line for further characterization in this study. Several tissues from line 22 were analyzed for expression of human tau ~65 kd by immunoblotting. No Tg tau was found in other organs (Figure 1D), even after long overexposure (data not shown). All animals characterized in this study derived from line 22 are heterozygous and are named THY-Tau22. During this study two females (5 to 7 months old) and three males (17 months old) died, representing an

overall mortality of 3% in THY-Tau22 mice. No mortality was observed in the littermate WT controls. The Tg mice had a reduced bodyweight compared to their WT littermates by ~15% (THY-Tau22, 22.87 ± 0.47 g; WT, 26.95 ± 0.44 g, *n* = 8 males per group, 2 months old, ****P* < 0.001; THY-Tau22, 28.25 ± 0.53 g; WT, 34.76 ± 1.25 g, *n* = 8 males per group, 7 months old, ****P* < 0.001; THY-Tau22, 27.42 ± 1.43 g; WT, 32.47 ± 0.76 g, *n* = 8 males per group, 14 months old, ***P* < 0.01). This effect was similar in females.

AD-Relevant Pathological Tau Hyperphosphorylation and Conformation in THY-Tau22 Mice

Under normal physiological conditions tau is a highly soluble protein that becomes insoluble by conformational changes and pathological phosphorylation in AD and in frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). The result is a translocation of the insoluble tau species from the axon, accumulation in the cell bodies, and formation of NFT.

Sections of THY-Tau22 mouse brain and homogenates from dissected cortices were screened with a battery of

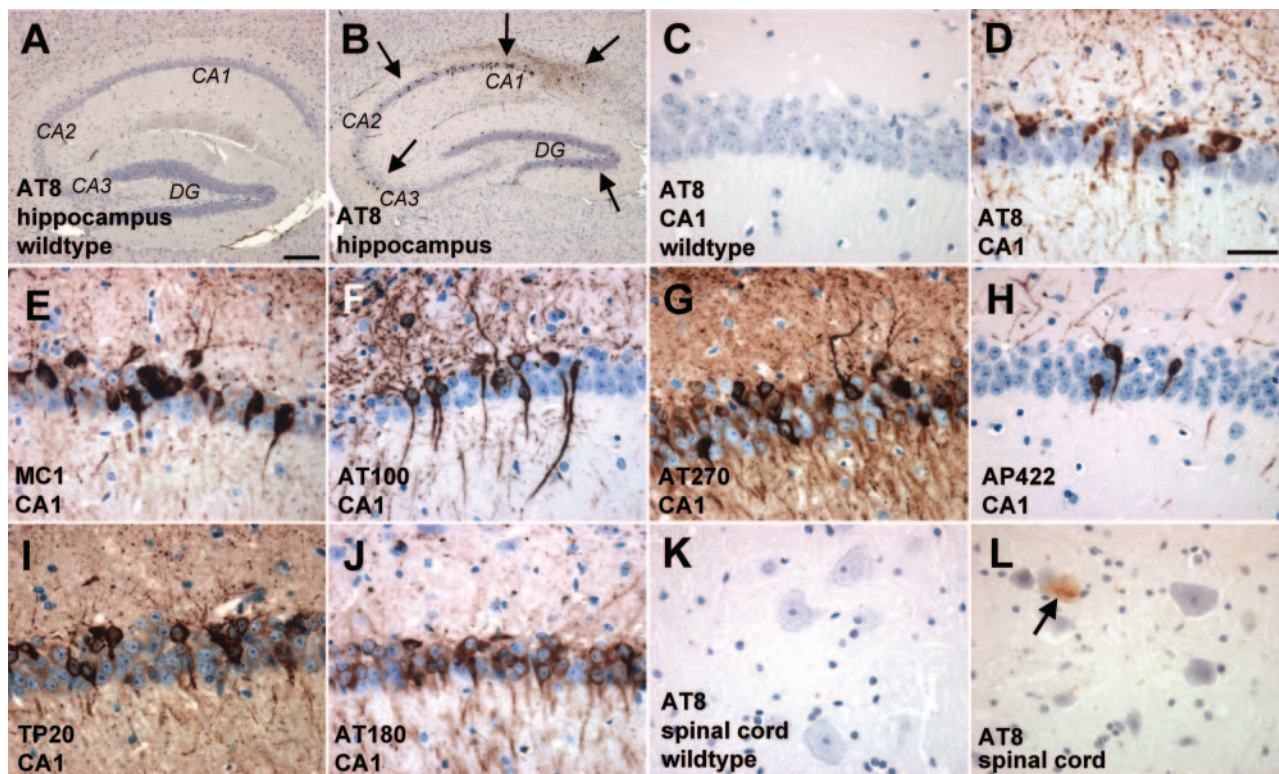


Figure 2. Accumulation of pathological tau species in THY-Tau22. Immunohistochemical studies revealed the accumulation of abnormal tau conformation and phosphorylation in 12-month-old THY-Tau22 compared to non-Tg WT mice in hippocampus (A and B, note the **arrows** pointing to the most representative dots in the Tg), CA1 sector (C–J), and spinal cord (K and L, note the **arrow**). Hyperphosphorylation was identified as brown color and detected with AT8 (A–D and K–L), AT100 (F), AT270 (G), AP422/988 (H), human-specific TP20 tau antibody (I), AT180 (J), and abnormal tau conformation with MC1 (E). No positive labeling was observed after parallel processing of littermate WT tissue (A and C, 12 months old). Representative sections are shown of 10 animals used at the age indicated. Scale bars: 200 μm (A, B); 25 μm (C–L).

phospho-specific antibodies (Figures 2 and Figure 4 and Supplementary Figure S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). Phosphorylation of tau was present from the age of 3 months (AT8 and AT270) and 6 months (PHF-1, AT100, AT180, and AP422/988; Figure 4A) and abnormal conformational changes of tau using MC1 antibody by 3 months (data not shown). Abnormal tau species were detected in neocortex, the hippocampus—starting early and being very prominent in the CA1 pyramidal layer (Figure 2, C–J) and spreads later to the dentate gyrus (DG) and CA3 subfield—the striatum, the olfactory bulb, the occipital cortex, the amygdala, the ventral thalamic nuclei, and deep layers of the entorhinal cortex (Supplementary Figure S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). The number of neurons containing pathological tau species significantly increased with age (demonstrated by PHF-1 immunoreactivity and Gallyas silver stain in Figure 3). Even in 12-month-old THY-Tau22 mice, only a few phospho-tau-positive cells were detected in the spinal cord (Figure 2L) and in the deep cerebellar nuclei (data not shown). Before abnormal tau species became detectable in neuronal cell bodies they were earlier observed in axonal tracts and neurites (eg, the mossy fibers in the hippocampus; data not shown). In older mice labeling was associated with well-defined intracellular inclusions in neuronal perikarya and in proximal portions of dendrites (Figures 2 and 3), indicating that phosphorylated tau was translocated to the cell bodies.

Older mice at 12 months showed the full AD-like spectrum of tau pathology including tau hyperphosphorylation and pathological tau phosphorylation (Figures 2 and 4), formation of NFT-like Gallyas silver-positive inclusions (Figure 3), tau filaments (Figure 5), and ghost tangles (Figure 6, F–G). However, a minor reduction in the number and size of AT8-positive neurons in aged THY-Tau22 in cell bodies in the frontal cortex, the CA1 and CA3 region, and in neurites and fiber tracts of the whole hippocampus was observed (data not shown). All stainings were similar between genders with a very small tendency in males toward increased tau pathology and highly consistent when mice of the same age were compared. None of the antibodies used showed any immunoreactivity in non-Tg animals in immunohistochemistry (Figure 2, A and C). There was no staining of glial cells with any of these antibodies.

Homogenates of frontal cortex from 3- to 14-month-old mice were analyzed by immunoblotting. In general, tau proteins separated as a complex set of bands reflecting the expression of differentially phosphorylated isoforms (Figure 4A). Immunoblotting of total human tau with M19G revealed a 64-kd band that was present at 3 months and increased with age and a 69-kd-band that appeared at 6 to 10 months and increased with age, representing the hyperphosphorylated and abnormal phosphorylated variants of the Tg isoform. AD-like hyperphosphorylation of Thr181 (AT270) and Ser396 was de-

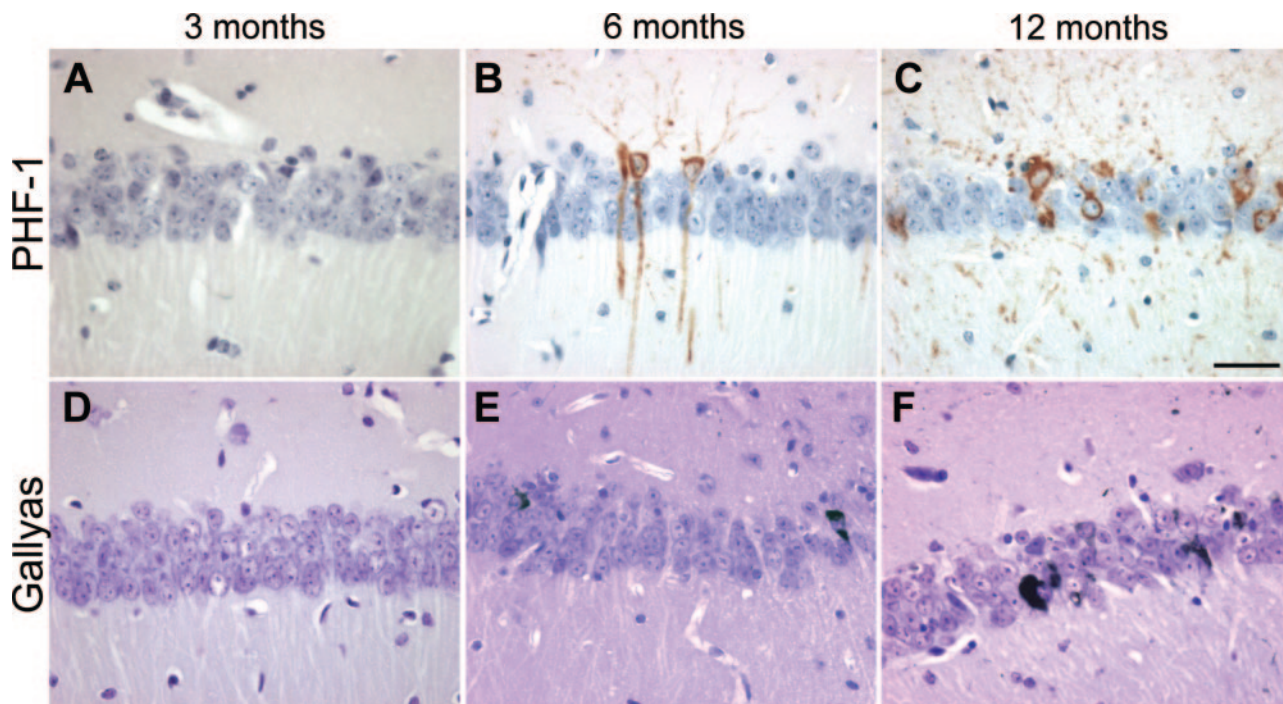


Figure 3. Age kinetics of neurofibrillary inclusions and tau accumulation in THY-Tau22 mice. Progressive formation of PHF-1 immunoreactivity (A–C, brown color) and Gallyas silver-positive inclusions (D–F, black color) were age-dependent in CA1 in tau Tg mice showing phospho-tau and NFT-like formation starting from 6 months in the CA1 region. Representative sections of three to five animals used at the age indicated are shown. Scale bar = 25 μ m.

tected on the 64-kd band from 3 months and on the 69-kd band from 6 months. Interestingly, murine tau phosphorylated at site Ser396 was also detected in the WT at 10 to 14 months. Tau hyperphosphorylation of Ser202/Thr205 (AT8) was only visible on the 69-kd band from 6 months and of Thr231 (AT180) on both the 64-kd band and the 69-kd band from 6 and 10 months, respectively. Abnormal tau phosphorylation at Thr212/Ser214 (AT100) and Ser422 (AP422/988) occurred from 6 to 10 months, but was only observed on the upper tau band 69-kd tau.

Both mutations used in the present construct were shown to decrease tau binding to microtubules. Thus, we also investigated phosphorylation within the microtubule-binding domains using the 12E8 antibody that recognizes Ser262 and 356. Tau phosphorylation was clearly detected as soon as 3 months. As previously described, the antibody also labeled the AD tau triplet but not a sample of a brain with Pick's disease (PiD).²² Altogether, these data indicated that there is no PiD-like phosphorylation pattern in THY-Tau22 mice.

Neurofibrillary Inclusions in THY-Tau22 Mice

Neurons containing aggregated tau were identified by traditional Gallyas silver staining in the pyramidal cell layer of the CA1 region (Figure 3) and the frontal cortex at 6 months. The number of neurons stained significantly increased with age. In addition, by 12 months argyrophilic staining is also detected in the DG, the CA3 region, and the amygdala (data not shown). Moreover, ghost tangles were detected in CA1 at 12 months (Figure 6,

F–G) by combining Gallyas silver staining with AT8 and hematoxylin as a nuclear counterstain.

Ultrathin sections of the Ammon's horn layer of the hippocampus of tau Tg mice were examined by transmitted electron microscopy to study the ultrastructural aspects of the neuronal inclusions. Pyramidal neurons containing large cytoplasmic fibrillary inclusions are regularly detected in THY-Tau22 mice (Figure 5, A and C). Most of these inclusions were composed of bundles of regularly spaced straight filaments (Figure 5B). These filaments had a mean diameter of 19.4 ± 1.5 nm (mean \pm SD). Occasionally, we also observed wider filaments (mean largest diameter of 31.9 ± 2.5 nm; Figure 5D) showing regular constrictions every 129.3 ± 17.4 nm.

Cell Loss and Neurodegeneration in THY-Tau22 Mice

Neurodegeneration is one of the hallmarks of AD brain and is mainly observed in the brain areas affected by tangles and plaques, such as the Ammon's horn, hippocampus, and parietal cortex. In THY-Tau22 mice staining with the nuclear dye DAPI decreased from 12 months onwards in the CA1 region, indicating a progressive cell loss in THY-Tau22 mice (Figure 6, A–D). A decrease in cell number and in staining intensities was observed. At 17 months there was a clear decrease in cell size as well (Figure 6D).

To confirm the cell loss observed with DAPI staining, sections from the CA1 region of 6- to 15-month-old THY-Tau22 and WT mice were stained with Nissl/cresyl-violet.

A decrease in the density of the pyramidal CA1 cell layer and a 34% decrease in the number of pyramidal neurons were evident in THY-Tau22 mice by 12 months (Figure 6E; $**P < 0.01$). At 12 months holes in the CA1-cell layer were also detected, seeming to be attributable to dying cells not being replaced, and at 15 months the size of the pyramidal neurons were also reduced (data not shown).

Gliosis in THY-Tau22 Mice

Reactive astrocytes and microglia cause neuronal damage and therefore play critical roles in the development and progression of AD. Although, gliosis is tightly asso-

ciated to senile plaques, the near environment of neuronal tangles is affected as well. An increase in the number of astroglial GFAP-positive cells is observed in the hippocampal hilus of aged THY-Tau22 mice (Figure 7), as well as in the cerebral cortex, corpus callosum, CA1 region, and the CA3 region (data not shown). The number of GFAP-positive cells increases with age in both WT and Tg mice. The overall number of microglial cells, visualized by binding to lectin, is also slightly increased in THY-Tau22 mice. Interestingly, there is an accumulation of astroglial and microglial cells near the vicinity of neurons containing large amounts of phospho-tau (Supplementary Figure S1 at <http://ajp.amjpathol.org>).

Decreased Synaptic Transmission in THY-Tau22 Mice

To determine whether the tau pathology in THY-Tau22 mice results in alterations in synaptic transmission, we examined the ability to generate excitatory synaptic responses in the hippocampus of tau Tg mice. Field excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) were elicited in the CA1 area by stimulating the Schaffer collaterals with increasing intensities (input/output plots). In 6- to 7-month-old THY-Tau22, there was no alteration in the size of the synaptic responses compared to WT controls (Figure 8A). By contrast, a marked decrease in synaptic excitability was observed in 14- to 15-month-old animals (Figure 8B). The mean amplitude of the EPSPs at the highest stimulation intensity (300 μ A) was 0.289 ± 0.045 mV and 1.24 ± 0.050 mV for THY-Tau22 mice and WT controls, respectively. These data suggest a loss or malfunction of the synapses in THY-Tau22 mice by 80%. To evaluate further the properties of these synapses, we examined their capacity to express LTP, a form of synaptic plasticity that is believed to be involved in memory formation,²⁵ in response to a tetanic stimulation. In 6- to 7-month-old animals, the mean LTP was $193 \pm 21\%$ and $206 \pm 16\%$ in WT and THY-Tau22 mice, respectively. These values were not significantly different ($P > 0.6$; unpaired *t*-test). Similarly, in 14- to 15-month-old animals, the amount of LTP was $185 \pm 32\%$ and $186 \pm 21\%$ in WT and THY-Tau22

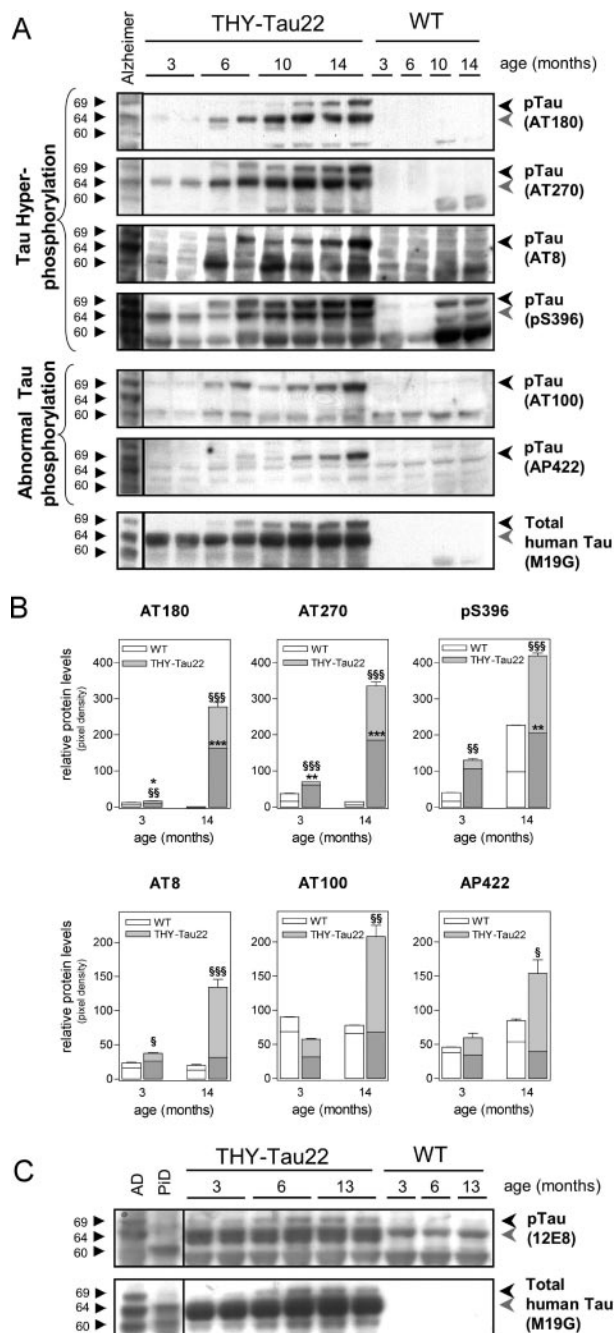


Figure 4. Increase of tau hyperphosphorylation and abnormal tau phosphorylation in the aged THY-Tau22 mouse brain. **A:** Immunoblot analysis of the major AD-relevant tau phosphorylation epitopes. Hyperphosphorylation of tau in cortex at sites Thr231 (AT180), Thr181 (AT270), Ser202/Thr205 (AT8), and Ser396 are detectable from 3 to 6 months and increase with age. Only phosphorylation of murine tau-Ser396 can be detected in aged WT. Abnormal tau phosphorylation at sites Thr212/Ser214 (AT100) and Ser422 (AP422/988) starts at 6 to 10 months. The levels of total human tau protein increase slightly with age in THY-Tau22 mice. Brain homogenate from an AD patient is loaded in the first lane. Triplets of hyperphosphorylated tau isoforms are indicated (69, 64, and 60 kd). Most antibodies detect a duplet of hyperphosphorylated tau in mice, indicated by the black and gray arrowheads. **B:** Quantification of site-specific tau phosphorylation of three individual blots with at least five animals per age and genotype. Densities of the 64 (bottom bars in dark gray; * = significance) and 69-kd band (top bars in light gray, § = significance) were determined in duplicates. Background noise was subtracted for each lane (unpaired Student's *t*-test, * $^{\$}P < 0.05$, ** $^{\$}P < 0.01$ and *** $^{\$}P < 0.001$). **C:** Immunoblot of 12E8, an antibody that detects phosphorylation of Ser262 and Ser356, which are microtubule-binding domains 1 and 3. 12E8 allows for the discrimination between AD and PiD. Old tau Tg revealed a phosphorylation profile that is comparable to that found in AD. Note that even endogenous murine tau is detected in the WT and Tg. Representative immunoblots are shown.

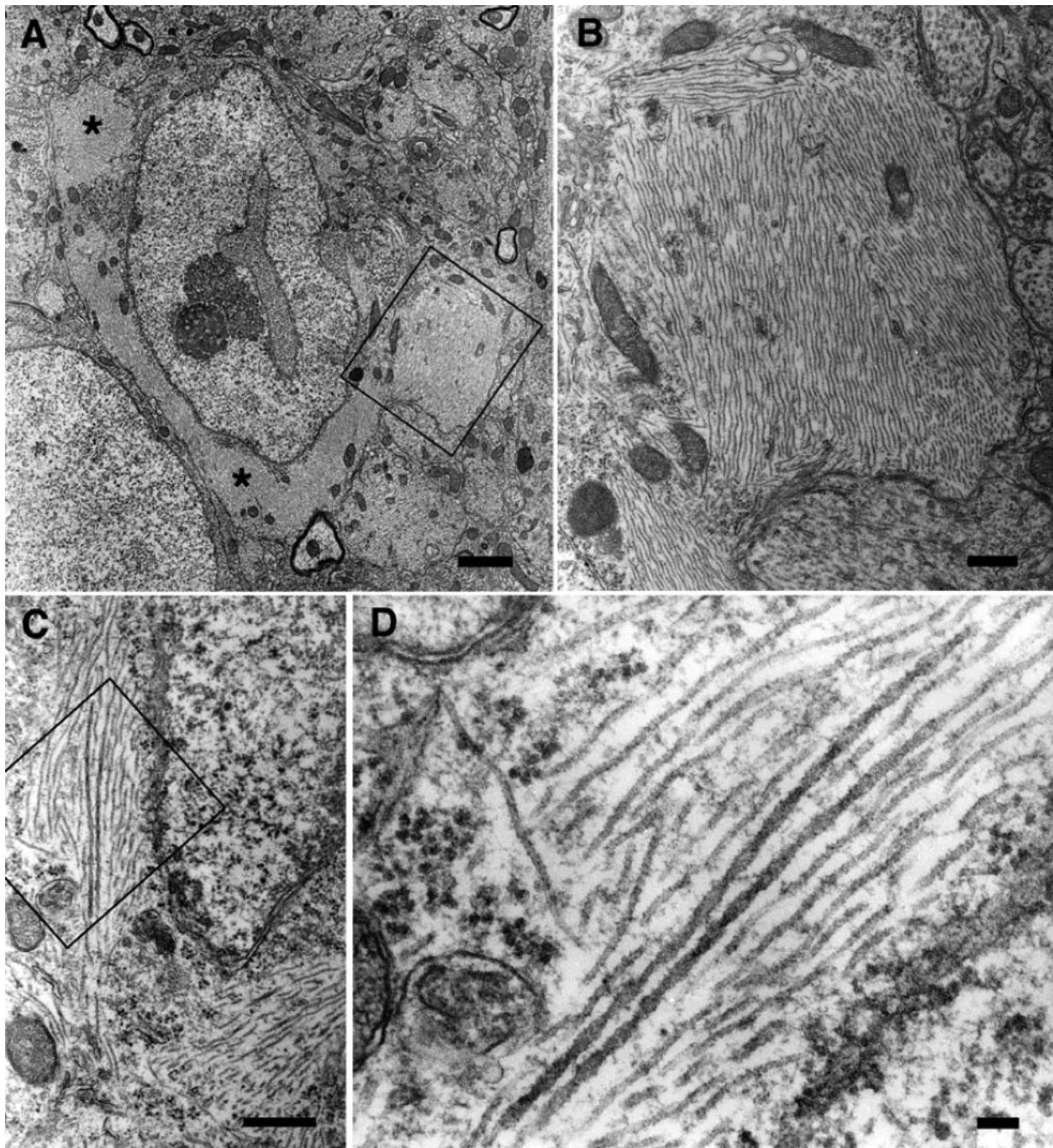


Figure 5. Ultrastructural aspect of fibrillar inclusions in hippocampal neurons from THY-Tau22. **A:** A hippocampal neuron of a 15-month-old THY-Tau22 mouse contains several massive fibrillar inclusions (asterisks). **B:** Higher magnification of the boxed area in **A**. Fibrillar inclusions are composed of bundles of straight filaments. **C:** Bundles of abnormal filaments in another hippocampal neuron. **D:** Higher magnification of the boxed area in **C**, showing the co-existence of straight filaments and occasional wider filaments with regular constrictions. Representative sections are shown. Scale bars: 2 μm (**A**); 0.5 μm (**B**, **C**); 100 nm (**D**).

mice, respectively ($P > 0.9$), indicating that LTP remains normal despite the marked alteration observed at the level of synaptic transmission and suggesting that other synapses remained functional. To verify whether this is a malfunction or a loss of synapses we compared levels of synaptic vesicle-associated proteins, synaptophysin (SYP; major synaptic vesicle protein p38), and synaptotagmin I. Immunoblots of synaptophysin and synaptotagmin displayed no major changes between THY-Tau22 and age-matched WT but a small decrease at 15 months by 20%

(Figure 8C). Hence, it seems that the decrease in basal transmission is not only the reason of a synaptic loss but also a malfunction of synapses in aged THY-Tau22.

No Motor Dysfunction in Young and Aged THY-Tau22 Mice

Any tau pathology in spinal cord neurons could lead to motor deficits and paralysis of the limbs and all previous

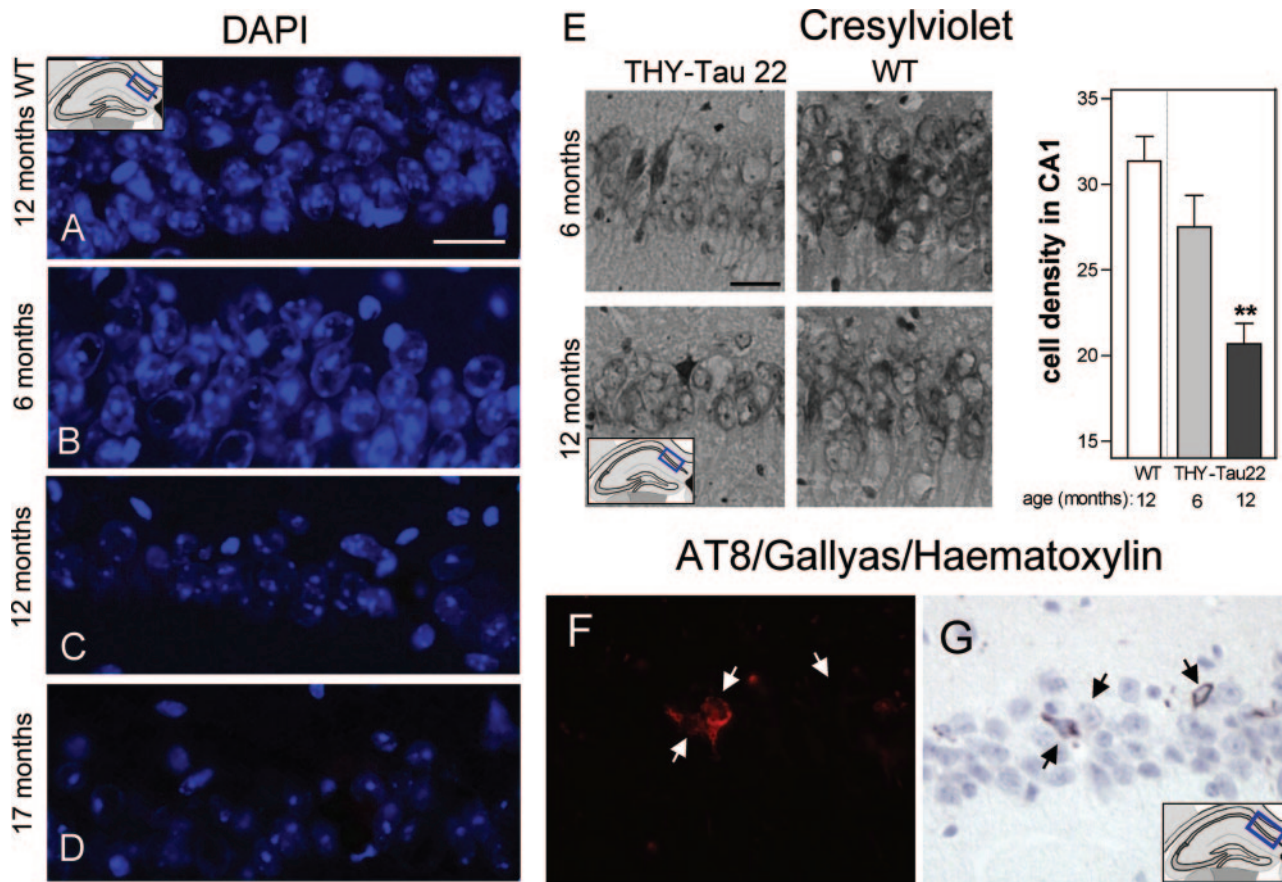


Figure 6. Loss in cell density, neurodegeneration, and ghost tangles in aged THY-Tau22. **A–D:** DAPI-stained neurons of the CA1 cell layer in a 12-month-old WT (**A**) and in THY-Tau22 at 6 (**B**), 12 (**C**), and 17 (**D**) months. Note the decrease in DAPI staining intensity and the reduced cell density with increasing age in the tau Tg mice. Scale bar = 20 μ m. **E:** Decrease of cell density in aged THY-Tau22 and semiquantification of Nissl/Cresylviolet-stained cells in the CA1 cell layer (analysis of variance with Bonferroni's post test $**P < 0.01$ Tg versus WT at 12 months; $n = 3$ per age and genotype). Scale bar = 20 μ m. **F:** AT8 immunolabeling combined with **G:** Gallyas staining and hematoxylin staining. Three cells with different staining patterns are shown by the **arrows** (from **left to right**): **left:** an AT8 and Gallyas-positive cell, with a nucleus; **middle:** an AT8-positive but Gallyas-negative cell, with a nucleus; **right:** a Gallyas-positive and AT8-negative cell, without nucleus. Note the loss of AT8 immunoreactivity and the argyrophilic extracellular NFT in the latter, which corresponds to a late ghost tangle.

Tg mouse models expressing human tau have described the development of motor impairment and spinal pathology in adult and elderly animals.^{7,26–28} To demonstrate further that our model does not show a severe spinal cord pathology that could result in motor dysfunction and thereby impair behavior tests that afford proper motor function, spinal cords were dissected for histological and immunohistochemical analyses. Minor traces of human tau became detectable in the spinal cord by 3 to 6 months, and their amount increased slightly in aged mice (Figure 1, B and C, and Figure 2L). No atrophy or morphological changes were observed in sections from spinal cord. Although the detectable amounts of human tau in the spinal cord are relatively low, we assessed their physiological effect.

In a modified Irwin protocol to evaluate general behavior, motion and movability, muscle strength, and some physiological parameters, there was no difference between THY-Tau22 and WT mice, except for the already mentioned decrease in bodyweight and an overall increase in nervous behavior in the THY-Tau22 mice. Male tau Tg mice at all ages (3 to 14 months old, $n = 8$ per group) showed the same ability than the WT animals to balance their way across an elevated wire, to grasp at

during 5 seconds, and to climb back on the wire. During the grasping period no limb preferences were observed.

The general motor activity of the Tg animals was analyzed in the elevated plus maze. No changes between THY-Tau22 and WT regarding the numbers of total arm entries, the total distance moved, their running speed, and the time being inactive were observed (Table 2). The only difference found was that the Tgs spent more time in open arms whereas the WTs preferred to explore the enclosed ones and thereby a different number of entries in open arms (Figure 9, A–F). In addition, the tau Tg mice were investigated for their ability to run on a rotating drum (the rotarod). As shown in Table 2, no significant differences were observed. However, there was a small tendency that THY-Tau22 mice could run longer on the rotarod, indicating apparently improved motor skills with a preference in male animals (data not shown). We could demonstrate in subsequent experiments that the size of male WT mice at 6 months (~35 g) was at the limit for an accurate run on the rotarod. Because the THY-Tau22 mice have a reduced size, they apparently show better motor skills compared to their bigger WT littermates. Because of the smaller size of females, this effect was less pronounced in the female sex. However, no dysfunc-

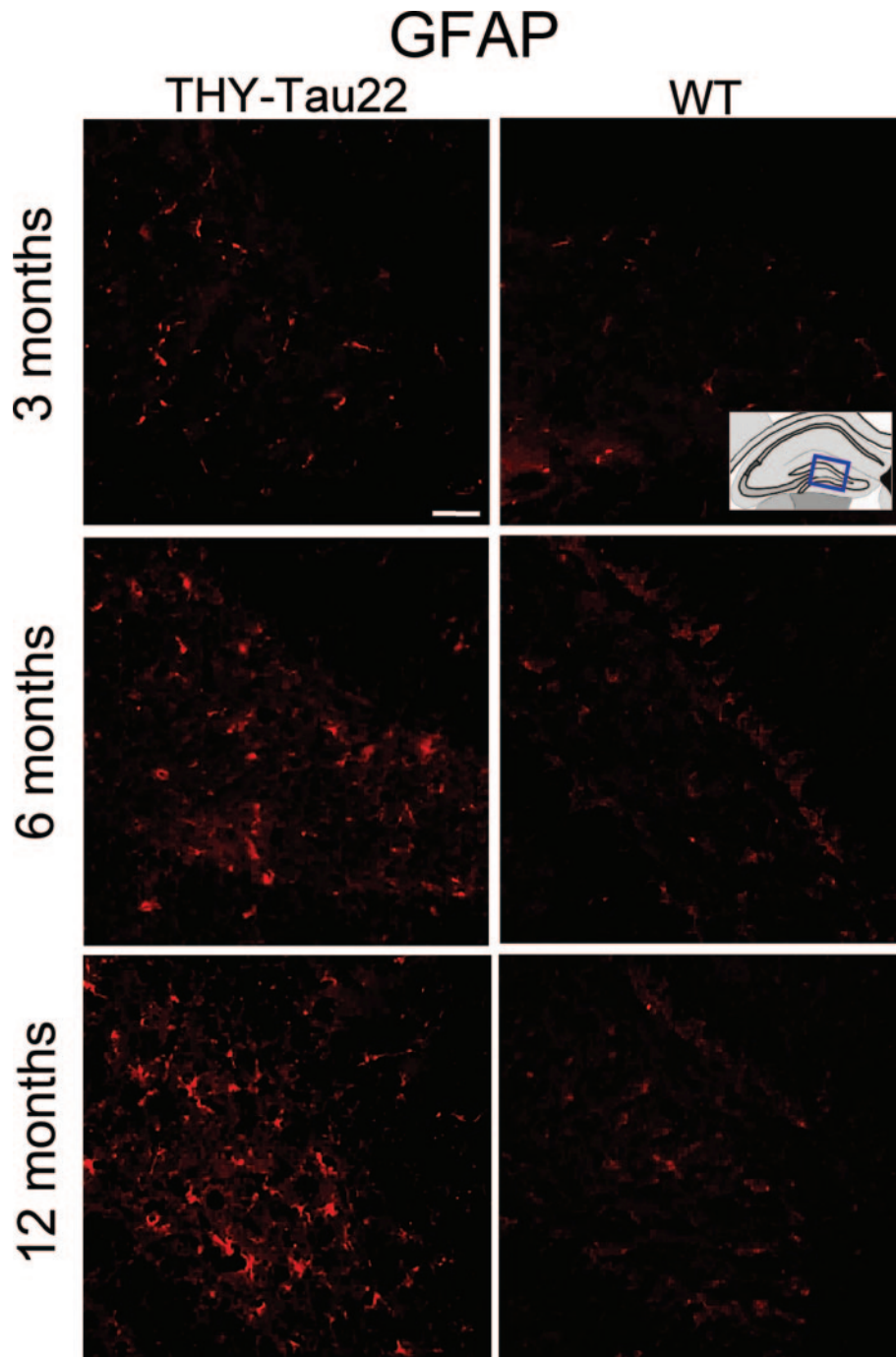


Figure 7. Gliosis in THY-Tau22 mice. GFAP-immunoreactivity in the hippocampal hilus is increased in THY-Tau22 mice compared to WT animals at 3, 6, and 12 months. Representative sections of 10 mice are shown. Scale bar = 20 μ m.

tion of motor skills and no signs of motor impairment and paralysis were found in THY-Tau22 up to an age of 18 months.

Behavioral Abnormalities in THY-Tau22 Mice

The most common early symptoms of AD are memory deficits and cognitive impairment. Because no change was observed in motor activity and locomotion, THY-Tau22 mice were assessed in a battery of different be-

havioral tests to detect any changes in anxiety, cognition, and memory to evaluate the behavioral effects of tau pathology. To examine anxiety, 6-month-old mice were observed in an elevated plus maze (Figure 9A). The time the tau Tg animals spent in the open arms of the plus maze was significantly increased compared to sex-matched littermates (Figure 9, B-F). Non-Tg littermates appeared to recognize their location and preferred to remain within the closed arm of the maze, whereas THY-Tau22 mice tended not to discriminate between the

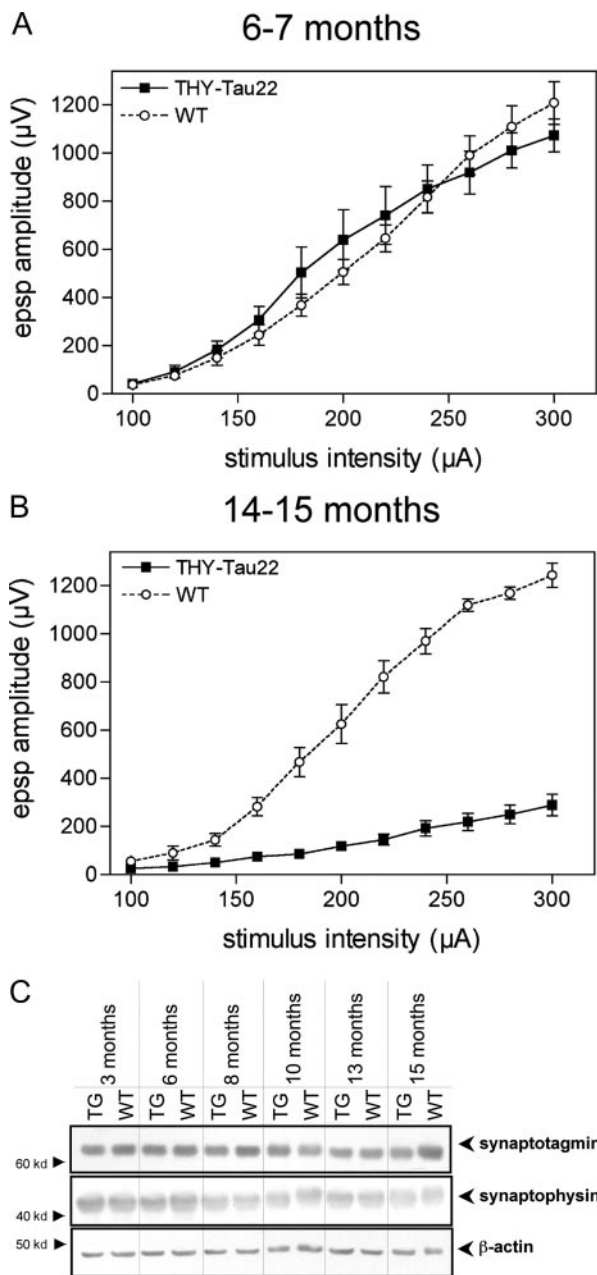


Figure 8. Decreased synaptic transmission in the hippocampus of THY-Tau22 mice. **A:** Input/output plots of the amplitude of the field excitatory postsynaptic potentials in the CA1 area elicited by stimuli of increasing intensity in hippocampal slices prepared from 6- to 7-month-old WT (open circles) and THY-Tau22 Tg mice (filled squares). Two-way analysis of variance of the EPSP amplitude values throughout the 100- to 300- μ A stimulation intensity range indicated no significant effect of genotype ($F_{[1,8]} = 0.0931$; $P > 0.7$). **B:** Input/output plots from 14- to 15-month-old animals, indicating impaired synaptic function by 80% compared to age-matched WT. Analysis of variance indicated a highly significant effect of genotype ($F_{[1,4]} = 207.2$; $***P < 0.001$). At least five animals were used per group. **C:** Protein levels of synaptotagmin I and synaptophysin, proteins that are involved in synaptic integrity, are not significantly changed between Tg (THY-Tau22) and WT. Thus, a small decrease by 20% was detected in 15-month-old THY-Tau22. However, a synaptic malfunction of basal transmission in old THY-Tau22 appears not to be due only to a minor loss of synaptic proteins. Representative immunoblots are shown.

closed and open arms of the maze. As indicated above, these findings cannot be explained by differences in locomotor activity because the overall spontaneous loco-

Table 2. No Changes in Overall Motor Activity and No Motor Deficits in THY-Tau22 Mice

	Sex	n	Mean (cm) \pm SEM
Motor activity			
Total distance in cm			
THY-Tau22	M	8	806.4 \pm 84.63
WT	M	8	867.5 \pm 90.42
THY-Tau22	F	7	896.2 \pm 119.1
WT	F	8	786.2 \pm 38.70
Inactive time in seconds			
THY-Tau22	M	8	213.0 \pm 6.80
WT	M	8	202.4 \pm 6.75
THY-Tau22	F	7	212.4 \pm 6.62
WT	F	8	214.0 \pm 5.79
Total number of arm entries			
THY-Tau22	M	8	23.63 \pm 3.04
WT	M	8	26.25 \pm 2.26
THY-Tau22	F	7	19.86 \pm 3.39
WT	F	8	24.13 \pm 1.76
Motor skills on the rotarod			
Time running at 25 rpm in seconds			
THY-Tau22	F	7	46.75 \pm 16.47
WT	F	8	35.00 \pm 13.60

Data of total distance walked, inactive time, and number of total arm entries in the elevated plus maze (EPM) was analyzed for general motor activity. No changes between tau transgenics and age-matched WT from the same litter could be determined. To reveal whether the minor expression of transgene in spinal cord has an effect on motor function in THY-Tau22, the motor skills of tau transgenics and WT were determined on the rotarod. No differences could be found indicating a normal motor function in THY-Tau22. All data were not statistically significant between transgenics and WT (unpaired Student's *t*-test, $P > 0.05$).

motion and general motor activity were not altered between the genotypes (Table 2).

THY-Tau22 mice (at 2 to 3, 7, 10 and 14 months; $n = 8$ per group) were also subjected to a cognitive test for spatial learning and memory, the MWM. During a 4-day training period, the mice were tested in four trials per day for their ability to locate a hidden platform aided by visual clues surrounding the water pool. The WT mice quickly learned to find the platform, whereas the learning of the tau Tgs was delayed (for 10-month mice see Figure 10A). The delayed learning in the tau mice was significant on day 2 and day 3 (Figure 10, A and D-E), but by day 4 of testing there was no difference between THY-Tau22 and WT mice (Figure 10A). Figure 10B shows that there was also a significant impairment in learning on training day 3 in THY-Tau22 mice at 2 to 3 months, 10 months, and 14 months.

To examine spatial memory performance mice that had previously received a 4-day training period did not receive training for 5 days and were then tested on day 9 for their ability to search for the platform in the same water pool with visual clues, but where the platform had been removed. At 10 and 14 months the THY-Tau22 mice were significantly poorer at remembering the quadrant where the platform had been placed than age-matched WT (Figure 10C). The time the THY-Tau22 mice spent in the goal quadrant was below the chance level of 15 seconds, ie, the time expected for mice who had never received training (compare also Figure 10, F and G). In addition, in a pilot study with a slightly modified protocol, 6-month-old

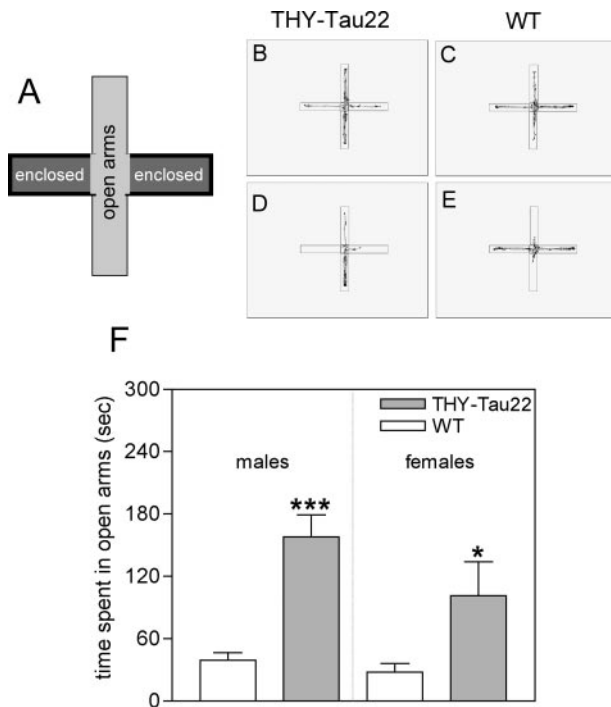


Figure 9. Altered anxiety in the elevated plus maze in THY-Tau22 mice. Impaired anxiety in THY-Tau22 mice. **A:** Model of the elevated plus maze (EPM) used with two enclosed arms and two open arms. The mice were placed in the middle facing an open arm and their movements were recorded throughout 5 minutes. Representative locomotion traces for THY-Tau22 (**B, D**) and WT (**C, E**) mice in the elevated plus maze. **F:** THY-Tau22 mice spend more time in the open arms of the elevated plus maze compared to their littermate WT (157.9 ± 21.23 seconds for male THY-Tau22 versus 39.29 ± 7.334 seconds for male WT, ****P* < 0.0001; 101.3 ± 32.62 seconds for female THY-Tau22 versus 27.95 ± 8.078 seconds for female WT, **P* < 0.05; *n* = 8 per group, 6 months old).

THY-Tau22 mice also had significantly delayed escape latencies and spent less time in the goal quadrant in the probe test (data not shown).

Discussion

We have generated and characterized a new tau Tg mouse model expressing human 4-repeat tau with the double mutations G272V and P301S under the Thy1.2 promoter in the absence of any motor dysfunction. These mice were generated using the htau46 isoform (2+ 3–10+), as it is one of the most common tau isoforms in human brain²⁹ and adult rodents.³⁰ G272V is one of the first described mutation in FTDP-17 in the first microtubule binding repeat motif in all tau isoforms^{31,32} whereas P301S is found in the second microtubule binding repeat motif in 4R tau isoforms. In addition, the P301S mutation shows a very early mean age of onset for FTDP in man.³³

Compared with other tau Tg mouse models, the THY-Tau22 model has a rather early onset of tau pathology starting at 3 to 6 months (Table 3), especially for a heterozygous genotype. The variability among the individuals was very small. Although in a recent published inducible tau model with expression of P301L-tau, NFT-like formations occur at 3 months,⁹ in most other hemizygous tau Tg mice tau pathology starts at 5 to 15

months.^{7,8,10,12–16,26,34,35} Moreover, most of them suffer from motor dysfunction after 10 months.^{7,10,14,16,26,34,36} Interestingly, in a Tg mouse model with tau cDNA bearing three FTDP-17 mutations³⁷ the tau pathology started particularly early at 1.5 to 3 months. This suggests that the number of mutations may accelerate the onset of tau pathology. Because we wanted to study the early stages of tau accumulation rather than the very late we choose to use two mutations to have a greater time window with a good resolution for each stage of the pathology in a heterozygous background.

To achieve a strong transgene expression in neurons the Thy1.2 promoter was chosen.²¹ Other promoters are either not neuron-specific such as the platelet-derived growth factor (PDGF) promoter or weak such as the CaMK-II (Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II) promoter. The main criticism of the Thy1.2 promoter is its strong efficiency in motor neurons. Thus, in the selection of mice lines for further characterization we excluded lines with high transgene expression in the spinal cord to avoid potential motor deficits that could prevent characterization of the mice throughout their whole lifespan and in behavior tests. Altogether, these criteria allowed for the selection of the THY-Tau22 mouse line. In this model, tau is predominantly expressed in the brain, and the mice do not display any motor deficits. These tau mice also display some of the phenotypic changes that have been previously observed in AD tau pathology. These include hyperphosphorylation and abnormal phosphorylation of tau, the presence of NFT-like formations, loss of functional synapses, and astrogliosis. These biochemical and pathophysiological changes are also accompanied by mild cognitive impairment.

The use of FTDP-17 mutations raises the problem of THY-Tau22 mouse as a model of tauopathy rather than AD. It is clear that the present model does not display amyloid pathology and thus, it is not a full AD model. However, our goal was to develop a model close to the tau pathology in AD. There are numerous features indicating that the pathology observed in this model is closer to that found in AD than in other tauopathies. For instance, FTD is a pool of dementia, which includes not only FTDP-17 (with tau mutations) but also dementia lacking distinctive histopathology (DLDDH), PiD, and other entities. Regarding DLDDH, the model shows tau aggregation and thus, by definition does not belong to DLDDH. FTDP-17 is heterogeneous at both neuropathological and biochemical levels. For instance, in patients presenting the G272V mutation, the neuropathological hallmarks are Pick bodies.^{31,32} Similarly, patients with P301S mutation exhibit heterogeneous clinical and pathological features (parkinsonism, corticobasal degeneration, or fronto-temporal dementia) and both NFT and glial fibrillary tangles.^{38–41} The present model, even with two mutations on the tau cDNA, does not display such heterogeneity and may not be clearly identified as a model of FTDP-17. This model is not typical of Pick disease (PiD) because tau pathology is not made of three-repeat tau isoforms and tau filaments do not form Pick bodies. In addition, tau phosphorylation at Ser262 can be used to discriminate between PiD and AD or corticobasal degeneration.²² Tau

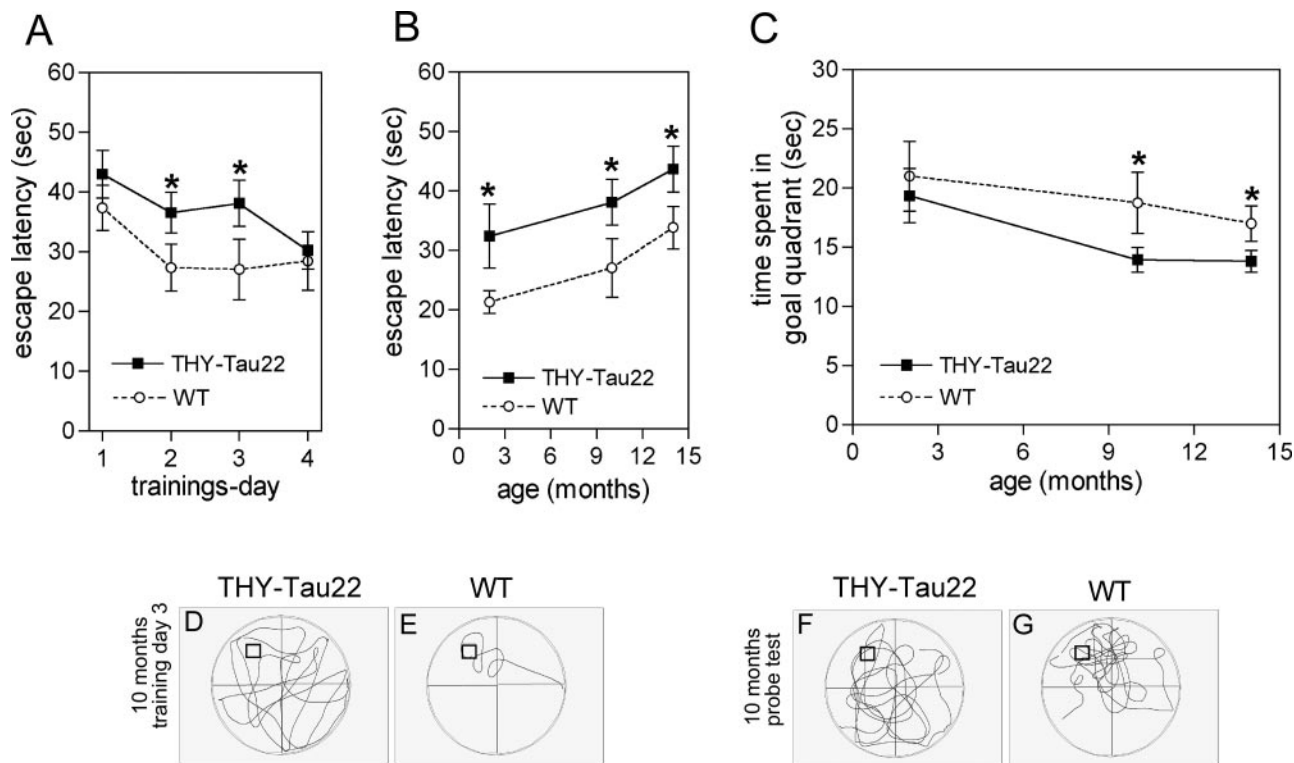


Figure 10. Retarded learning and reduced memory in THY-Tau22 mice. Delayed learning in the MWM in THY-Tau22 mice. **A:** Escape latency, the time to find the hidden platform in the MWM, during the 4-day training period in 10-month-old THY-Tau22 mice (filled squares, $n = 8$) and WT (open circles, $n = 8$). Day 1, THY-Tau22 42.95 ± 3.979 seconds versus WT 37.33 ± 3.815 seconds; day 2, THY-Tau22 36.52 ± 3.412 seconds versus WT 27.34 ± 3.894 seconds, $*P < 0.05$; day 3: THY-Tau22 38.08 ± 3.849 seconds versus WT 27.00 ± 4.912 seconds, $*P < 0.05$; day 4, THY-Tau22 30.21 ± 3.140 seconds versus WT 26.51 ± 4.901 seconds; Two-way analysis of variance, $*P > 0.05$ for genotype, $*P > 0.05$ for learning). **B:** Escape latency in MWM in 2- to 3-, 10- and 14-month-old THY-Tau22 and WT on training day 3. THY-Tau22 display a delay in learning (two-way analysis of variance $**P < 0.01$ for genotype, $*P < 0.05$ for age, $n = 8$ per group). **C:** Five days after the last training the platform was removed and a probe test was performed. The time the mice spent in the quadrant where the platform used to be (= goal quadrant) is plotted against age. Aged animals show a mild memory deficit compared to age-matched WT ($n = 8$ per group). Representative locomotion traces of THY-Tau22 (**D, F**) and WT (**E, G**) during the learning period (**D, E**) and the probe test (**F, G**).

phosphorylation at Ser262 is clearly detected in THY-Tau22. Thus, the present model is not representative of FTDP-17, DLDH, and PiD. Nevertheless, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration exhibit aggregation of 4R tau isoforms such as in the present model. However, once again, there is no motor deficit in the present model whereas motor deficits are observed in these pathologies. Taken together, this is the first tau mouse model demonstrating AD-like tau pathology without displaying any motor deficits.

Tau phosphorylation was observed at the major sites involved in both abnormal phosphorylation and hyperphosphorylation of tau in AD.⁴² However, hyperphosphorylation and abnormal phosphorylation have also been described in many stress conditions including hibernation and starvation.^{43,44} These phenomena were described as reversible, but it seems not the case in tau Tg mice.^{9,28} In the present model, tau hyperphosphorylation and abnormal phosphorylation increase with age. It is correlated with the appearance of NFT, silver staining, and filaments. Thus, hyperphosphorylation and abnormal phosphorylation are clearly pathological in the present work. Moreover, the age-related increase in phospho-tau immunoreactivity is comparable to that found in AD brains at different Braak stages.⁴⁵ The abnormal tau phosphorylation at Thr212/Ser214 increases with age

and is well correlated with the number of NFT-like formations, indicating that a dysregulation in tau phosphorylation may be instrumental in tau aggregation, as suggested previously in P301L mice.⁴⁶ The observed 64-kd tau band corresponds to a hyperphosphorylated tau variant, whereas the 69-kd tau band is the abnormally phosphorylated form of tau that has been described in human AD brains.²⁹ Therefore, it seems that the presence of the 69-kd tau band is necessary for the evolution of NFTs.

Phospho-tau immunoreactivity in neurites and fiber tracts of the whole hippocampus started early, increased up to 6 months (Figure 3B) and then decreased with a degeneration of the axonal tracts (Figure 3C). The size of AT8 immunoreactive cell bodies decreased in the frontal cortex, the CA1 and CA3 region in old THY-Tau22, suggesting that neurons containing tau phosphorylated at sites Ser202/Thr205 (AT8) are more prone to undergo degeneration. Similar findings indicating that tau phosphorylation at sites Ser202/Thr205 correlates with the severity of neuronal cytopathology have been observed in AD brain.⁴⁷ By contrast, recent observations suggest that extensive cell death can occur independently of formation of NFT-like formations³⁵ and that NFTs do not invariably cause neuron death⁹ implying an NFT-independent mechanism of neuronal death.

Table 3. Comparison of the Most Common Tau Transgenic Models and Other Models with Tauopathy

Tau transgenic models					
Promoter	Mutation	Begin of tau brain pathology	Phospho-tau in spinal cord	Motor impairment	Reference
PrP	P301L	5 months	Detectable at 5 months	Yes at 6.5 months (hemizygous)	7
CamK-II (inducible <i>tet-off</i>)	P301L	2.5 months	n.d. at 2.5 months	Yes at 9.5 months	9, 28
Thy1.2	P301L	3 months	Detectable at 3 months	Yes (muscle atrophy and weakness)	8
Thy1.2	P301S	5 months	Detectable at 5 months	Yes at 5 months (homozygous)	10
Thy1	G272V P301L R406W	1.5 months	Detectable at 1.5 months	No abnormality up to 12 months	37
CamK-II	R406W	5 months	Detectable at 5 months	No abnormality up to 23 months	13
Thy1.2	G272V P301S	3 months	Minor traces at 3 to 6 months	No abnormality up to 18 months	Present study
APP or PS1 and tau double/triple-transgenic models					
Promoter	Transgene expression	Begin of tau brain pathology	Phospho-tau in spinal cord	Motor impairment	Reference
Thy1.2 (Tau, APP), PS1-KI	Tau _{P301L} xAPP _{sw} xPS1 _{M146V}	12 months	No data available	No data available	63
PrP (Tau), PrP(APP)	Tau _{P301L} xAPP _{sw}	6 months	3 months	Yes	60
Other transgenic models with tau pathology					
Promoter	Targeted gene	Begin of tau brain pathology	Motor impairment	Reference	
–	<i>pin1</i> (–/–)	2 years	No		64
NSE	<i>p25</i>	4 months	No paralysis but increased spontaneous locomotor activity		65

CamK-II, Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II; KI, knockin; NSE, neuron-specific enolase; n.d., not detectable; Pin1, peptidyl-prolyl cis/trans isomerase 1; PrP, prion protein promoter; (–/–), knockout.

In summary, this model shows a rather high resolution of different steps in tau pathology that allows us to investigate the very early stage when tau phosphorylation starts at the first sites in the CA1 and cortex (3 months), a stage when hyperphosphorylation is much more advanced, more sites are involved in tau phosphorylation, abnormal phosphorylations begins, the pathology spreads to the DG, and more NFT-like inclusions occur (6 months), a stage with massive hyper and abnormal phosphorylation, the occurrence of phospho-tau and NFT-like inclusions at many anatomical sites, and the beginning of degenerative processes (10 months) and finally a stage with neurodegeneration, advanced cell loss, malfunction of hippocampal synapses, and ghost tangles (14 months). In our model tau pathology starts in CA1 and less pronounced in frontal cortex and then spreads to DG, other cortical regions, and amygdala.

GFAP-positive cells are detected rather early in the pathology of THY-Tau22 mice and increase with age but are not a striking feature of the model. In a P301S tau model⁴⁸ and a Tg mouse overexpressing the shortest human tau isoform,¹⁶ a similar astrogliosis and increased microglia has been shown to concentrate around tau-positive nerve cells, mainly in the brainstem and spinal cord. In a P301L tau model astrogliosis was also found surrounding phospho-tau-positive neurons⁸ in the amygdala and cortex.

However, the astrogliosis observed in all of these tau Tg models is relatively mild compared to that found in APP- and APP/PS1-Tg mice⁴⁹ and in AD brain.⁵

The tau pathology of THY-Tau22 mice is also accompanied by a deficit in synaptic transmission in the hippocampus. The reduction in basal synaptic transmission indicates that there is a malfunction of the synapses in the hippocampus. Because no significant changes in proteins involved in synaptic vesicles were found and because the response to LTP remained normal, despite the marked alterations observed at the level of synaptic transmission, this suggests that the remaining synapses were functional. Decreases in hippocampal neural activity have also been detected in old V337M tau Tg mice.¹² In AD synaptic loss is closely related to APP and amyloid plaques.⁵⁰ AD-relevant mutations of APP were shown to contribute to synaptic dysfunction in Tg animals⁵¹ and to appear, by contrast to our model, rather early in pathology.

The neurodegeneration in THY-Tau22 is rather mild compared to that observed in AD. Additional stereological analysis will be necessary to document further the neuronal loss in the entorhinal cortex and other cortical regions. Neurodegeneration and cell loss have also been observed in other tau Tg mouse models with tau mutations at sites P301S,¹⁰ P301L,^{7,8} V337M,¹² and R406W.^{14,36,37}

Before subjecting the tau Tg mice to a behavioral test for learning and memory, we evaluated whether minor expression of transgene in spinal cord in old animals caused any motor dysfunction. Young and aged THY-Tau22 did not show any changes in motion, coordination, muscle strength, motor skills, and general motor behavior compared to the WTs. This indicates that the traces of phospho-tau found in the spinal cord of elderly Tgs are not sufficient to cause motor deficits. The absence of motor dysfunction is essential for a proper analysis of rodents in behavioral studies. Behavioral tests are dependent on the animal's movement (running, swimming) and motor coordination. Any motor impairment caused by transgene expression severely impairs behavior testing, is extremely unfavorable for the test outcome, and makes it impossible to interpret the data. All other previous common tau Tg mouse models display sooner or later pathological denervation, atrophy, or phosphorylated tau in the spinal cord^{7,8,10,14,27,28} accompanied by motor impairment or even paralysis. Although all these tau models provide a beautiful histopathology similar to AD and contributed a lot to understand the role of tau in AD, the occurrence of even minor motor deficits makes it hard to analyze properly their behavior data.

The general motor behavior of THY-Tau22 was not changed. This is an important advantage of the THY-Tau22 model because decreased locomotion¹³ or increased spontaneous locomotion and increased exploratory behavior^{12,52} has been observed in other tau models. The reduced anxiety-like behavior observed in the elevated plus maze could be attributable to the transgene expression and/or the expression of phospho-tau in amygdala nuclei, because amygdala lesions have been associated with anxiolytic effects in this maze test.⁵³ A similar decrease in anxiety has also been observed in V337M tau Tgs,¹² although this was also accompanied by an increase in spontaneous locomotion.

In the MWM, a hippocampal-dependent visuo-spatial learning task, the early presence of phospho-tau in the hippocampus could explain the delayed learning in THY-Tau22 mice at all ages. However, because transgene expression under the Thy1.2 starts at postnatal day 6,²¹ we cannot exclude that postnatal development involving neuronal sprouting, number of neuronal connections, and neuronal targeting is affected by the transgene, as well. The fact that spatial memory performance is only impaired at 10 and 14 months could be explained, at least in part, by the increase in the number of argyrophilic inclusions, because the number of NFTs is correlated with the severity of cognitive dysfunction in AD.⁵⁴ No significant differences in spatial learning and memory were observed in P301L tau mice⁵⁵ and V337M tau mice.¹² However, R406W tau mice displayed reduced memory in a passive avoidance test¹⁴ and impairment in a test for associative memory and cued fear conditioning.¹³ Arendash and co-workers⁵⁵ have also demonstrated a significant correlation between the number of tau-positive neurons in the neocortex of JNPL3 mice and delayed escape latency in the MWM. A recently published mouse model with suppressible tauP301L expres-

sion⁹ showed motor dysfunction at 10 months that impairs the swim speed in the MWM.²⁸

The present tau Tg model exhibits only a part of the full AD pathology. Its generation aims to understand the evolution and mechanisms of pathogenic tau aggregation in AD. In AD, tangle formation occurs early in pathogenesis and is preceded by the generation of amyloid plaques.⁵⁶ It is still a subject of discussion whether APP is involved in tau aggregation or vice versa.^{57,58} In our model, A- β immunoreactivity and Congo Red staining were not detectable, and APP metabolism was not altered (data not shown). In the future, it would be of interest to analyze in the present model the effect of amyloid on neurofibrillary degeneration propagation as it was described in the models of Götz and colleagues⁵⁹ and Lewis and colleagues.⁶⁰

In conclusion, THY-Tau22 mice display the main features of tau pathology and several of the pathophysiological disturbances observed in AD in the absence of any motor deficits. This mouse model therefore represents a valuable tool to understand further the role and the mechanisms regulating pathological degeneration during tau hyperphosphorylation and tau aggregation in AD.

Acknowledgments

We thank Kunie Ando for helping with biochemical analysis and André Delacourte for providing human brain homogenates.

References

1. Arendt T, Bigl V, Arendt A, Tennstedt A: Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 1983, 61:101-108
2. Scott SA, DeKosky ST, Sparks DL, Knox CA, Scheff SW: Amygdala cell loss and atrophy in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1992, 32:555-563
3. West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC: Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 1994, 344:769-772
4. Gomez-Isla T, Price JL, McKeel Jr DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT: Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1996, 16:4491-4500
5. Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, Grubeck-Loebenstien B: How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* 2004, 3:169-176
6. Coleman P, Federoff H, Kurlan R: A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology* 2004, 63:1155-1162
7. Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M: Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 2000, 25:402-405
8. Gotz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM: Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* 2001, 276: 529-534
9. Santacruz K, Lewis J, Spire 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: Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005, 309:476–481
10. Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M: Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 2002, 22:9340–9351
 11. Gotz J, Tolnay M, Barmettler R, Chen F, Probst A, Nitsch RM: Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur J Neurosci* 2001, 13:2131–2140
 12. Tanemura K, Murayama M, Akagi T, Hashikawa T, Tomimaga T, Ichikawa M, Yamaguchi H, Takashima A: Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci* 2002, 22:133–141
 13. Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A: Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:13896–13901
 14. Ikeda M, Shoji M, Kawarai T, Kawarabayashi T, Matsubara E, Murakami T, Sasaki A, Tomidokoro Y, Ikarashi Y, Kuribara H, Ishiguro K, Hasegawa M, Yen SH, Chishti MA, Harigaya Y, Abe K, Okamoto K, St George-Hyslop P, Westaway D: Accumulation of filamentous tau in the cerebral cortex of human tau R406W transgenic mice. *Am J Pathol* 2005, 166:521–531
 15. Brion JP, Tremp G, Octave JN: Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1999, 154:255–270
 16. Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VM: Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 1999, 24:751–762
 17. Duff K, Knight H, Refolo LM, Sanders S, Yu X, Picciano M, Malester B, Hutton M, Adamson J, Goedert M, Burki K, Davies P: Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* 2000, 7:87–98
 18. Lo MM, Fieles AW, Norris TE, Dargis PG, Caputo CB, Scott CW, Lee VM, Goedert M: Human tau isoforms confer distinct morphological and functional properties to stably transfected fibroblasts. *Brain Res Mol Brain Res* 1993, 20:209–220
 19. Vidal M, Morris R, Grosveld F, Spanopoulou E: Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J* 1990, 9:833–840
 20. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA: Reelin in plaques of beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 2001, 316:145–148
 21. Hirrlinger PG, Scheller A, Braun C, Quintela-Schneider M, Fuss B, Hirrlinger J, Kirchhoff F: Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 2005, 30:291–303
 22. Mailliot C, Sergeant N, Bussiere T, Caillet-Boudin ML, Delacourte A, Buee L: Phosphorylation of specific sets of tau isoforms reflects different neurofibrillary degeneration processes. *FEBS Lett* 1998, 433:201–204
 23. Braak H, Braak E: Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol* 1991, 1:213–216
 24. Irwin S: Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968, 13:222–257
 25. Bliss TV, Collingridge GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993, 361:31–39
 26. Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciort R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F: Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 1999, 155:2153–2165
 27. Terwel D, Lasrado R, Snauwaert J, Vandeweert E, Van Haesendonck C, Borghgraef P, Van Leuven F: Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J Biol Chem* 2005, 280:3963–3973
 28. Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, Santa-Cruz K, Guimaraes A, Yue M, Lewis J, Carlson G, Hutton M, Ashe KH: Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci* 2005, 25:10637–10647
 29. Sergeant N, David JP, Goedert M, Jakes R, Vermersch P, Buee L, Lefranc D, Watez A, Delacourte A: 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* 1997, 69:834–844
 30. Lee G, Rook SL: Expression of tau protein in non-neuronal cells: microtubule binding and stabilization. *J Cell Sci* 1992, 102:227–237
 31. Spillantini MG, Crowther RA, Kamphorst W, Heutink P, van Swieten JC: Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau. *Am J Pathol* 1998, 153:1359–1363
 32. Bronner IF, ter Meulen BC, Azmani A, Severijnen LA, Willemsen R, Kamphorst W, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC: Hereditary Pick's disease with the G272V tau mutation shows predominant three-repeat tau pathology. *Brain* 2005, 128:2645–2653
 33. Sperfeld AD, Collatz MB, Baier H, Palmbach M, Storch A, Schwarz J, Tatsch K, Reske S, Joosse M, Heutink P, Ludolph AC: FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann Neurol* 1999, 46:708–715
 34. Probst A, Gotz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Burki K, Goedert M: Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000, 99:469–481
 35. Andorfer C, Acker CM, Kress Y, Hof PR, Duff K, Davies P: Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* 2005, 25:5446–5454
 36. Zhang B, Higuchi M, Yoshiyama Y, Ishihara T, Forman MS, Martinez D, Joyce S, Trojanowski JQ, Lee VM: Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci* 2004, 24:4657–4667
 37. Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J: FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* 2001, 18:702–714
 38. Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G, Tabaton M, Morbin M, Primavera A, Carella F, Solaro C, Grisoli M, Savoiardo M, Spillantini MG, Tagliavini F, Goedert M, Ghetti B: Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, 58:667–677
 39. Lossos A, Reches A, Gal A, Newman JP, Soffer D, Gomori JM, Boher M, Ekstein D, Biran I, Meiner Z, Abramsky O, Rosenmann H: Frontotemporal dementia and parkinsonism with the P301S tau gene mutation in a Jewish family. *J Neurol* 2003, 250:733–740
 40. Casseron W, Azulay JP, Guedj E, Gastaut JL, Pouget J: Familial autosomal dominant cortico-basal degeneration with the P301S mutation in the tau gene: an example of phenotype variability. *J Neurol* 2005, 252:1546–1548
 41. Yasuda M, Nakamura Y, Kawamata T, Kaneyuki H, Maeda K, Komure O: Phenotypic heterogeneity within a new family with the MAPT p301s mutation. *Ann Neurol* 2005, 58:920–928
 42. Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, 33:95–130
 43. Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Hartig W: Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* 2003, 23:6972–6981
 44. Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A: 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* 2004, 24:2401–2411
 45. Sassin I, Schultz C, Thal DR, Rub U, Arai K, Braak E, Braak H: Evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes in the basal nucleus of Meynert. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000, 100:259–269
 46. Sahara N, Lewis J, DeTure M, McGowan E, Dickson DW, Hutton M, Yen SH: Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau:

- alteration of phosphorylation and solubility. *J Neurochem* 2002, 83:1498–1508
47. Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT: Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002, 103:26–35
 48. Bellucci A, Westwood AJ, Ingram E, Casamenti F, Goedert M, Spillantini MG: Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. *Am J Pathol* 2004, 165:1643–1652
 49. Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L: Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 2003, 184:247–263
 50. Masliah E, Mallory M, Hansen L, DeTeresa R, Alford M, Terry R: Synaptic and neuritic alterations during the progression of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994, 174:67–72
 51. Chan SL, Furukawa K, Mattson MP: Presenilins and APP in neuritic and synaptic plasticity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2002, 2:167–196
 52. Pennanen L, Welzl H, D'Adamo P, Nitsch RM, Gotz J: Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 2004, 15:500–509
 53. Decker MW, Curzon P, Brioni JD: Influence of separate and combined septal and amygdala lesions on memory, acoustic startle, anxiety, locomotor activity in rats. *Neurobiol Learn Mem* 1995, 64:156–168
 54. Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT: Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 1992, 42:631–639
 55. Arendash GW, Lewis J, Leighty RE, McGowan E, Cracchiolo JR, Hutton M, Garcia MF: Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Res* 2004, 1012:29–41
 56. Braak H, Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991, 82:239–259
 57. LaFerla FM, Oddo S: Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 2005, 11:170–176
 58. Delacourte A, Sergeant N, Champain D, Wattez A, Maurage CA, Lebert F, Pasquier F, David JP: Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 2002, 59:398–407
 59. Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM: Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 2001, 293:1491–1495
 60. Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E: Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001, 293:1487–1491
 61. Bussiere T, Hof PR, Mailliot C, Brown CD, Caillet-Boudin ML, Perl DP, Buee L, Delacourte A: Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 1999, 97:221–230
 62. Seubert P, Mawal-Dewan M, Barbour R, Jakes R, Goedert M, Johnson GV, Litsky JM, Schenk D, Lieberburg I, Trojanowski JQ, Lee VMY: Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 1995, 270:18917–18922
 63. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM: Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003, 39:409–421
 64. Fujimori F, Takahashi K, Uchida C, Uchida T: Mice lacking Pin1 develop normally, but are defective in entering cell cycle from G(0) arrest. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 265:658–663
 65. Ahljianian MK, Barrezueta NX, Williams RD, Jakowski A, Kowicz KP, McCarthy S, Coskran T, Carlo A, Seymour PA, Burkhardt JE, Nelson RB, McNeish JD: Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:2910–2915

1.3 Conclusions

1.3.1 Conception du Modèle Thy-Tau22

Afin de disposer d'un modèle *in vivo* de dégénérescence neurofibrillaire, nous avons entrepris la conception et la caractérisation d'un modèle murin basé sur des mutations pathologiques de Tau (cf. §3.2.1, p.49). Ce modèle surexprime l'isoforme humaine de Tau à 412 acides aminés (2⁺, 3⁻, 10⁺), une des isoformes les plus représentées au niveau du SNC (Sergeant *et al.*, 1997). Une double mutation P301S/G272V a été introduite dans la séquence codante de ce transgène ; ce choix étant basé sur l'hypothèse que la mutation P301S est caractérisée, chez l'homme, par un début de pathologie précoce (Bugiani *et al.*, 1999; Sperfeld *et al.*, 1999; Yoshiyama *et al.*, 2007) et qu'une double mutation conduirait à l'apparition d'une pathologie de façon plus rapide. L'expression de ce transgène a été placée sous le contrôle d'un promoteur post-natal Thy1.2 pour 1) éviter d'interférer avec la maturation du SNC embryonnaire et 2) permettre une expression centrée sur les cellules neuronales (Hirrlinger *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 1990).

Afin de s'affranchir des troubles moteurs observés dans les précédents modèles transgéniques (Tableau 4, p.53), associés à une expression du transgène dans les motoneurones de la moelle épinière et en raison d'un fort pouvoir du promoteur Thy1.2 à s'exprimer dans ces mêmes motoneurones, une sélection du fondateur de la lignée Thy-Tau22 a été nécessaire. Cette sélection a été basée sur le taux d'expression du transgène et sur l'absence de son expression dans la moelle épinière.

1.3.2 Analyse spatiale et temporelle de l'expression de la pathologie Tau dans les souris Thy-Tau22

Après sélection, l'analyse de l'expression du transgène a montré que la lignée Thy-Tau22 présentait une forte expression de Tau centrée autour des territoires cérébraux qui dégénèrent au cours de la MA à savoir : le cortex et l'hippocampe. En effet, comme attendu, l'analyse réalisée au niveau de la moelle épinière n'a montré l'expression du transgène qu'à l'état de traces et insuffisante pour générer une pathologie dans la moelle épinière.

L'analyse de la pathologie Tau a été réalisée par une double approche immunohistochimique et biochimique afin de caractériser cette pathologie à la fois dans

l'espace et dans le temps. L'analyse conjointe de ces résultats montre que la pathologie, caractérisée au niveau moléculaire par l'apparition de sites d'hyperphosphorylation (AT8, AT180, AT270, AP422, pS396, pS404, AD2) ([Figure 18A et C, p.64](#)) et de sites de phosphorylation anormale (AP422, AT100) spécifiques de la MA, débute de façon précoce chez les souris hétérozygotes (à partir de 3 mois) dans le champ CA1 de l'hippocampe. Au cours du temps cette pathologie s'étend à d'autres régions cérébrales (CA3 de l'hippocampe, striatum, bulb olfactif, cortex occipital, noyau thalamique ventral, amygdale, et cortex entorhinal) et la protéine Tau apparait sous une conformation anormale, visualisée en immunohistochimie par l'anticorps MC-1.

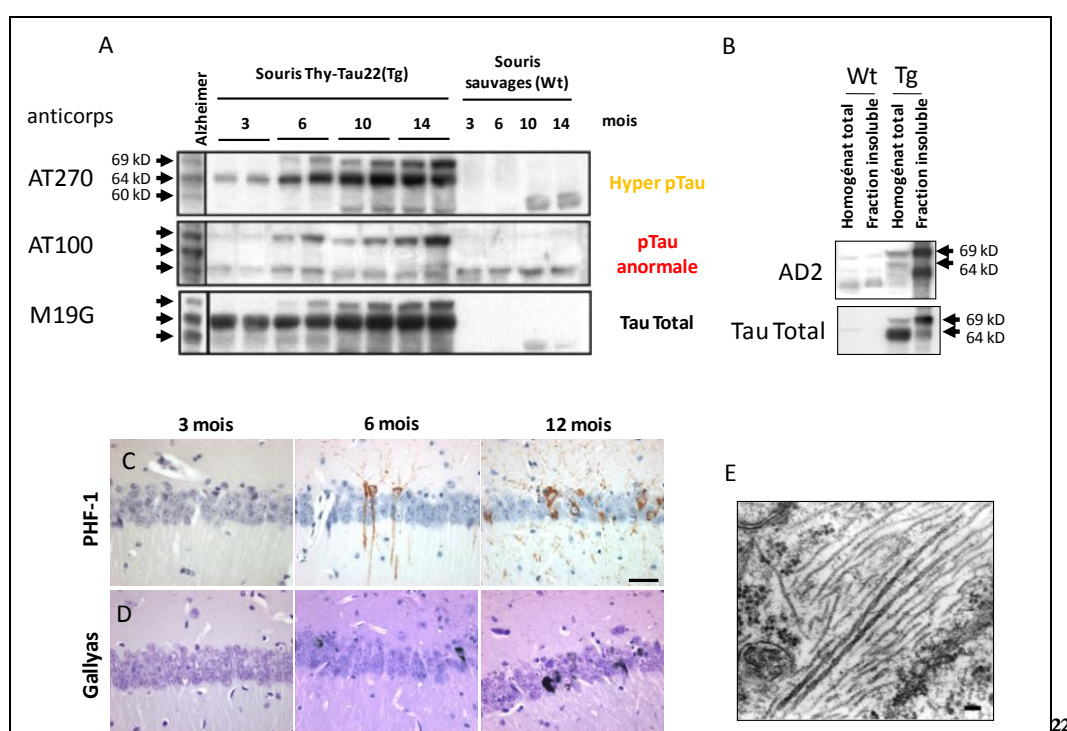


Figure 18 : Caractéristiques principales de la pathologie Tau observée dans la lignée de souris transgéniques Thy-Tau22 :

(A) Hyperphosphorylation et phosphorylation anormale observée au cours du vieillissement des souris transgéniques par analyse monodimensionnelle suivie d'une immunoempreinte des épitopes d'hyperphosphorylation et de phosphorylation anormale. (B) Purification au sarkosyl et analyse de la fraction insoluble de Tau par analyse monodimensionnelle et immunoempreinte de la protéine Tau phosphorylée (AD2 : pS396-pS404) et de la protéine Tau Totale. (C-D) Aspects histologiques des lésions neurofibrillaires dans le champ CA1 de l'hippocampe des souris transgéniques Thy-Tau22 au cours du vieillissement, (C) Immunohistochimie de la protéine Tau phosphorylée aux S396 et S404. (D) Imprégnation argentique des agrégats de protéines Tau par la technique du Gallyas. (E) Aspects ultra-structuraux en microscopie électronique à transmission des agrégats de protéines Tau organisés sous la forme de filaments analogues aux PHFs humains.

De façon parallèle, l'utilisation de techniques d'imprégnation argentique spécifiques de structures en feuillets β -plissés (marquage de type Gallyas), montre l'apparition concomitante

de matériel protéique agrégé (Figure 3 D-F de l'article, [Figure 18D, p.64](#)). Cette agrégation analysée par une approche ultra-structurale en microscopie électronique à transmission montre que ce matériel agrégé prend la forme de filaments de structure analogue à celle des filaments de Tau retrouvés dans les cerveaux de patients atteints de la MA (Figure 5 de l'article et [Figure 18E, p.64](#)). De plus, des techniques de purification du matériel protéique insoluble (préparations sarkosyl) ont permis d'isoler une fraction de Tau de masse moléculaire apparente plus élevée et égale à 69 kDa ([Figure 18B, p.64](#)). Cette fraction également mise en évidence par analyse monodimensionnelle et immunoempreinte des homogénats totaux de cerveau de souris, apparaît dès 6 mois et correspond à une fraction insoluble de Tau hyperphosphorylée et anormalement phosphorylée (Figure 4A de l'article et [Figure 18A,B, p.64](#)).

Enfin, l'analyse de la densité cellulaire par une coloration de Nissl au crésyl violet, ou une imprégnation nucléaire au DAPI, révèle une diminution importante de la densité cellulaire dans la couche cellulaire de la corne d'Ammon, au cours du vieillissement de ces souris. Cette couche cellulaire étant constituée majoritairement de neurones, la perte cellulaire observée dans cette couche reflète ainsi la perte neuronale dans l'hippocampe qui est significative à 12 mois (Figure 6 de l'article) et qui apparaît après la présence d'une pathologie Tau (déterminée sur des critères de dérégulation de la phosphorylation et d'agrégation).

1.3.3 Conséquences fonctionnelles de la pathologie Tau

Pour étudier les conséquences de cette pathologie Tau sur les capacités mnésiques des souris Thy-Tau22, nous nous sommes assurés, au préalable, que la très faible expression du transgène au niveau de la moelle épinière ne provoquait pas de troubles moteurs. En effet, les tests d'investigation de la mémoire dans les modèles murins sont basés sur des tests comportementaux faisant intervenir les capacités motrices.

L'analyse des résultats des tests moteurs présentés dans la Table 2 de l'article montre, comme attendu, que les souris Thy-Tau22 ne présentent aucun trouble moteur pouvant interférer avec la réalisation des tests comportementaux (Table 2 de l'article).

Pour l'investigation des capacités mnésiques de ces souris deux types de test ont été réalisés :

- un test de mesure de l'anxiété : Labyrinthe en croix surélevé (Plus Maze)

- un test de mesure de l'apprentissage et de la mémoire spatiale : Piscine de Morris (Morris Water Maze)

L'analyse conjointe des résultats de ces deux tests mène à la conclusion que les souris Thy-Tau22 présentent des troubles du comportement. Ces derniers sont caractérisés par des troubles de l'anxiété dans le labyrinthe en croix apparaissant dès l'âge de 6 mois (Figure 9 de l'article) et qui pourraient être reliés à une dégénérescence de l'amygdale, une structure très impliquée dans l'anxiété. L'analyse des performances des souris au test de la piscine de Morris, une tâche de mémorisation spatiale dépendante principalement du réseau neuronal de l'hippocampe, montre un déficit d'apprentissage des souris Thy-Tau22 mais également un déficit de mémorisation spatiale dès l'âge de 10 mois (Figure 10 de l'article). Ces résultats pourraient être reliés à la perte neuronale observée dans l'hippocampe et à la diminution de transmission synaptique globale dans l'hippocampe, mise en évidence par des techniques électrophysiologiques (Figure 8 de l'article).

En conclusion, ce travail a abouti au développement et à la caractérisation d'une nouvelle lignée de souris transgéniques Thy-Tau22 qui présente une pathologie Tau, sans manifester de troubles moteurs, et ce jusqu'à un âge avancé. Cette caractéristique spécifique du modèle tient à la sélection spécifique d'un fondateur de lignée ne présentant pas d'expression de Tau au niveau de la moelle épinière. En effet, la sélection d'un autre fondateur, présentant une expression de Tau, au niveau de la moelle épinière, a conduit à l'établissement d'une seconde lignée appelée Thy-Tau30 qui montre un phénotype différent avec l'existence d'importants troubles moteurs ([Annexe 3, p.135](#)). D'après nos analyses, ces déficits moteurs sont provoqués par une atrophie musculaire, secondaire à une axonopathie observée au niveau de la moelle épinière et des nerfs périphériques (Figure 1 et 2 de l'article en [Annexe 3, p.135](#)). De plus, il est intéressant de noter que cette axonopathie apparaît de façon précoce et antérieure à la DNF. Ces résultats, qui sont à rapprocher de ceux obtenus dans des modèles murins de surexpression de protéines Tau sauvages et certains modèles murins de DNF (Lewis *et al.*, 2000) où une axonopathie est également observée, appuient ainsi l'hypothèse que l'axonopathie observée dans ces modèles ne serait qu'une conséquence de la surexpression de la protéine Tau, connue pour altérer le transport axonal ([cf §1.2.2.1.a, p.13](#)). Enfin l'analyse comparative des lésions neurofibrillaires observées chez ces souris transgéniques, révèle, de façon intéressante, des différences dans la constitution moléculaire

entre les lésions observées dans l'hippocampe et celles de la moelle épinière avec notamment la participation des neurofilaments dans la formation des lésions spinales (Figure 11 et 12 de l'article en [Annexe 3, p.135](#)). Ces résultats suggèrent ainsi que les mécanismes de formation de ces lésions pourraient être différents en fonction du contexte neuronal.

Enfin, la sélection spécifique de notre modèle Thy-Tau22, nous a permis de mettre en évidence des déficits de l'apprentissage et de la mémorisation dans un exercice de mémoire spatiale hippocampo-dépendante, au cours du vieillissement de ces souris transgéniques. Cette association entre DNF et troubles cognitifs a été confirmée par la suite dans deux modèles murins récents ne présentant pas de troubles moteurs (Murakami et al., 2006) et JSW research 2007¹) et d'autres modèles murins dans lesquels certains tests comportementaux avaient été réalisés avant l'apparition des troubles moteurs (Arendash et al., 2004; Pennanen et al., 2006; Ramsden et al., 2005; Santacruz et al., 2005). Ainsi, la capacité d'investigation des troubles cognitifs, qui représentent le phénotype terminal d'un modèle d'étude de pathologies à troubles de mémoire, confère à ce modèle une place indispensable dans l'évaluation des stratégies thérapeutiques sur l'amélioration des performances cognitives. En outre, ce modèle présente une pathologie Tau bien caractérisée et séquentielle, avec une dérégulation de la phosphorylation de Tau, une agrégation de Tau et une perte neuronale, centrées sur l'hippocampe et le cortex. Il représente ainsi un modèle physiopathologique pertinent qui permettra d'étudier et/ou de valider de nouvelles hypothèses étiopathogéniques impliquées dans la cascade d'événements menant à l'agrégation de Tau et/ou à la mort neuronale. Ces hypothèses seront au préalable identifiées dans des systèmes cellulaires plus simples mais mieux adaptés à la manipulation moléculaire et aux études exploratoires.

¹http://www.jswresearch.com/fileadmin/media/pdf/mThy1-hTAU441_Flyer_06.06neu.pdf

2 Modifications anormales de Tau et modèles cellulaires

Afin d'étudier le rôle de la phosphorylation dans l'agrégation de Tau et/ou la mort neuronale, nous avons développé des modèles cellulaires simples consistant à 1) utiliser des constructions de Tau mutées connues pour augmenter le caractère agrégatif de Tau ou 2) moduler la phosphorylation de Tau par le biais d'une kinase neuronale : la Cdk5.

Néanmoins, pour rester dans un système proche du neurone humain, ces modèles cellulaires ont été développés dans des cellules SH-SY5Y qui dérivent d'un neuroblastome humain et présentent l'avantage d'être différenciables en cellules de type neuronal après un traitement d'une semaine par un facteur de croissance neuronal : le NGF.

2.1 Modèle de neuroblastome exprimant des Tau mutées DFTP-17

2.1.1 Objectifs

Si la découverte des mutations DFTP-17 a été à l'origine du développement de modèles de DNF *in vivo*, de nombreuses études se sont portées sur le développement de modèles cellulaires d'agrégation de Tau. En effet, l'obtention d'un tel modèle se révélerait être un outil de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires menant à l'agrégation de Tau et du lien entre agrégation de Tau et mort neuronale. Mises à part deux études récentes, basées sur la surexpression des constructions moléculaires particulières de Tau et ne correspondant à aucun processus physiopathologique (Iliev *et al.*, 2006; Khlistunova *et al.*, 2006), l'essentiel des études se sont portées sur la surexpression de protéines Tau mutées. Les résultats obtenus dans ces modèles montrent que les mutations ne sont pas capables, à elles seules, de provoquer l'agrégation de Tau telle qu'elle est observée dans les modèles murins. Cependant, ces études ont été réalisées dans des modèles cellulaires hétérologues ou des cellules humaines « non-neuronales » (cf. §3.2.1.2, p.53). Notre objectif a donc été de 1) développer un nouveau modèle cellulaire, surexprimant des protéines Tau mutées dans un contexte cellulaire proche de celui d'un neurone humain et 2) d'étudier, dans ce contexte, l'effet de deux mutations de Tau (P301S ou S305N) sur sa phosphorylation et son agrégation.

2.1.2 Résultats

Les résultats de ce travail sont présentés dans le **manuscrit qui fait l'objet d'une publication en préparation** :

Alexis Bretteville, Kunie Ando, Katharina Schindowski, Séverine Bégard, Anne Loyens, André Delacourte, Jean-Claude Beauvillain, Nicolas Sergeant, Malika Hamdane and Luc Buée. **Bi-dimensional analysis of Tau mutants reveals specific phosphorylation pattern linked to very early steps of Tau nucleation.**

Bi-dimensional analysis of Tau mutants reveals specific phosphorylation pattern linked to very early steps of Tau nucleation.

Alexis Bretteville^{1,2}, Kunie Ando^{1,2}, Katharina Schindowski^{1,2}, Séverine Bégard^{1,2}, Anne Loyens^{1,2}, André Delacourte^{1,2}, Jean-Claude Beauvillain^{1,2}, Nicolas Sergeant^{1,2}, Malika Hamdane^{1,2*} and Luc Buée^{1,2*§}.

¹ Inserm, U837, Place de Verdun, 59045 Lille, France.

² Université Lille 2, Faculté de Médecine, Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, Jean-Pierre Aubert Research Centre, Place de Verdun, 59045 Lille, France.

* Authors contributed equally

§ To whom correspondence should be addressed:

Inserm, U837, Université Lille 2, Faculté de Médecine, Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, Jean-Pierre Aubert Research Centre,
1 Place de Verdun, 59045 Lille, France.

Tel: +33 (0) 320 622074; Fax: +33 (0) 320 622079

buee@lille.inserm.fr

Keywords: Alzheimer's disease, FTDP-17 mutation, neuroblastoma cells, neurofibrillary degeneration, Tau aggregation, microtubule bundles.

Abstract

Alzheimer's disease and a group of pathologies so called Tauopathies are mainly characterized by aggregates of Tau proteins. Cells models could be helpful for exploratory studies on factors involved in Tau aggregation. With the discovery of FTDP-17 Tau mutations, many unsuccessful attempts have been done to modelise Tau aggregation. As almost of these studies have been done in "non-neuronal" human cells, we undertook the establishment and characterisation of new "human neuronal like" cell lines. These models stably overexpress either 4-repeat (4RTau) full length WT Tau or mutated Tau bearing FTDP-17 mutations (P301S or S305N). Analysis of differentiated SH-SY5Y cells cytoskeleton, revealed that overexpression of 4RTau leads to a dramatic remodelling of microtubule network without any proper effect of mutations. However, a novel approach of Tau phosphorylation analysis by 2D electrophoresis highlights that unlike WT Tau, mutated Tau displayed a different phosphorylation pattern linked to conformational changes and very first steps of Tau nucleation. Moreover, this model will be a suitable model to investigate other factors involved in molecular pathways leading to whole Tau aggregation and its related neuronal death.

Introduction

Tau aggregation is one of the key features common to a group of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, called Tauopathies. Even if Tau, in these pathologies, is always found aggregated and hyperphosphorylated, the question of whether the phosphorylation alone or in combination with others factors trigger Tau aggregation is still debated. The discovery in 1998 of Tau mutations associated with Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17), has allowed for generating Tau aggregation models. In this way, many animal models and especially Tau transgenic mice are well known to show a Tau pathology characterized by abnormal phosphorylation and Tau aggregation [1-5] ; and for review [6]. Beside these animal models, many attempts have been done to generate cell systems which could recapitulate molecular key features of Tau pathology and then could be more appropriate to carry exploratory studies on events involved in Tau aggregation. Two recent studies with specific Tau constructs showed an abnormal Tau behaviour in cells. The first study based on overexpression of N-terminal half truncated Tau bearing Δ K280 mutation showed an increase in Tau aggregation [7]. The second one showed that breaking specific motifs localised in microtubule binding repeats [8] rapidly induce Tau aggregation associated to appearance of phosphoepitopes observed in AD-Tau pathology. These models are interesting to test pharmacological approaches against Tau aggregation and suggest some hypothesis on Tau aggregation but it is not clear that full-length Tau without these additional mutations follows the same process of aggregation. Indeed, several strategies based on either pharmacological treatments with okadaic acid and Hydroxy-nonenal [9] or overexpression of Tau bearing FTDP-17 mutations have been developed (for review [10]). Most of these models with full-length WT or mutated Tau fail to recapitulate the whole hallmarks of AD-Tau pathology. As almost of these studies have been done in either non-

human cells or in “non-neuronal” human cells (*i.e.* proliferating cells), this lack of Tau pathological modifications could be explained by differences in molecular contents (*i.e.* kinases) between neuronal and non-neuronal cells. Then, we undertook Tau phosphorylation and Tau aggregation analyses of 4RTau bearing FTDP-17 mutations in a neuronal cell context. In this study, we report development and characterisation of new differentiated human neuroblastoma cell lines. These stable cell lines inducibly overexpress Wild-type Tau or two mutants Tau (P301S or S305N) which we previously described as displaying opposite effects regarding Tau binding to microtubule *in vivo* [11], overriding hence proper effects of mutations on Tau microtubule function.

Materials and methods

cDNA constructs and Site-directed Mutagenesis

The Tau cDNA coding for the human 412 amino acids 4-Repeat (4R) isoform (human Tau46, cloned from the human brain) was a kind gift from M. Goedert (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK). A polymerase chain reaction (PCR)-based site-directed mutagenesis (STRATAGENE, The Netherlands) was used to generate two distinct constructs coding for the 4RTau P301S or the 4RTau S305N mutant. The Wild-type and the mutated cDNA constructs were sequenced and inserted in the tetracycline inducible mammalian expression T-REX vector pcDNA4/TO © (INVITROGEN, France) (Fig.1).

Cell Culture of human Neuroblastoma SH-SY5Y and stable transfection

Human SH-SY5Y cell line over expressing tetracycline repressor was used as previously described [12] for transfections using ExGen500 (EUROMEDEX, France) according to the manufacturer's instruction. Stable cell lines were generated by transfection of the empty pcDNA4/TO alone or containing WT or mutated Tau cDNAs and by selection in presence of 100 µg/ml Zeocin (INVITROGEN). The isolated clones were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% Foetal Calf Serum, 1mM non-essential amino acids, 2mM (L)-Glutamine, 50 U/mL penicillin/streptomycin at 37°C, 100 µg/ml Zeocin and 5 µg/ml Blastocidin in a 5% CO₂ humidified incubator (all provided by INVITROGEN). For differentiation, cells were maintained for 7 days in DMEM/F12 medium supplemented with 2mM L-glutamine, 50U/mL penicillin/streptomycin, 7 µg/mL progesterone, 1% Insulin/Transferrin/selenium (INVITROGEN) and 5 ng/ml β-NGF

(REPROTECH INC., TEBU, France). Medium was replenished every 3 days. For induction of transgenes expression, cells were maintained in medium with 1µg/ml tetracycline [12].

Cell toxicity assay

Proliferating cells were seeded in 96-well plate (2000 cells/well) and tetracycline was added in medium for 1, 2 or 3 days. Cytotoxicity assays were performed by measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release according to the manufacturer's instructions (Cyto Tox96; PROMEGA, France). Each measure was done in triplicate.

Immunofluorescence

Cells were differentiated on poly-L-Lysine coated chamber CultureSlides™ (BD BIOSCIENCES, Belgium). After treatments, cells were fixed in methanol at -20°C for 15 mn and permeabilized with 0.25 % Triton X-100 (SIGMA) in PBS. After blocking in 2% (w/v) BSA for 1 hour at room temperature, slides were incubated overnight with primary antibody according to Table 1. After washing, secondary antibodies, Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG or Alexa Fluor 568 anti-rabbit IgG were used. Nucleus staining was obtained by incubating slides with 1µM TO-Pro3 solution (all from MOLECULAR PROBES/INVITROGEN) for 20 minutes followed by three times washes. Slides were mounted with Vectashield (Vector laboratories, Abcys, France). Negative controls were obtained by incubating slides with secondary antibodies alone. No cross reactions were detected neither by incubating mouse secondary antibody with rabbit primary antibody or by incubating rabbit secondary antibody with mouse primary antibody. Finally, images were acquired with a Leica TCS NT laser scanning confocal microscope.

Electron microscopy and Gold-immunolabeling

After treatments, cells were harvested in MES buffer (0.1M MES, 2mM MgCl₂, 0.5M EGTA, 1mM NaCl, pH 6.5) with complete protease inhibitors (ROCHE APPLIED SCIENCE, France) and phosphatase inhibitors : 125 nM okadaic acid (SIGMA-ALDRICH, France). Cells lysates were obtained in a dounce homogenizer and collected on perlonion coated nickel-200 mesh grids. After 10 mn blocking with 1% gelatine-PBS at room Temperature, grids were incubated with TauCter 1902 antibody diluted in PBS according to Table 1. After washing, colloidal gold (18 nm) labeled goat anti-rabbit immunoglobulins were used. Finally, counterstaining was made in 4% uranyl acetate in H₂O. Observations were done with a Zeiss 9025 electron microscope at high magnification (20 000X).

Western Blotting

Cells were harvested in modified RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 1% Nonidet P-40, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) with Complete Mini protease inhibitors (ROCHE APPLIED SCIENCE) and 125 nM okadaic acid, sonicated, and homogenized 1 h at 4 °C. Total proteins concentration was determined by the BCA assay Kit (PIERCE, Perbio, France). Samples were mixed to LDS Sample Buffer containing a reducing agent and then boiled at 100°C for 10 minutes, as recommended by the manufacturer (INVITROGEN). For 1D gel analysis, 10 µg of total proteins were loaded onto a 10% acrylamide gel (NuPAGE® INVITROGEN), blotted onto nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes (Hybond and Hybond-Phosphate from AMERSHAM/GE HEALTHCARE, France).

For two-Dimensional (2D) gel electrophoresis 100 µg of total proteins were dissolved in 400µl of 2D electrophoresis buffer (7M urea, 2M thiourea, 4% (v/v) Triton X-100, 20mM

dithithreitol and 0.6% (v/v) pharmalytes). Sonicated samples were loaded on immobilized pH gradient ReadyStrip IPG strip 3-10 (BIORAD, France), isoelectrofocused with the Protean IEF cell (BIORAD) by applying a total of 75kV/h, according to the manufacturer's instructions (all compared samples are processed in the same run of isoelectrofocalisation). The IPG strips were then equilibrated three times (15mn each) in a Laemmli Buffer (25 mM TrisHCl, 20 mM DTT, 10% Glycérol, 5% SDS, 0.05% Bromophenol Blue, pH 6.8). The IPG strips were layered onto a 10% Tris-Glycine Polyacrylamide Gel, SDS-PAGE was performed with a Protean II Xi Cell (BIORAD) and blotted onto nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes with Criterion Blotter (BIORAD) as recommended by the manufacturer. Immunoblots alignment was performed by alignment of no specifically products revealed by secondary antibody.

Membranes were blocked and incubated with the appropriate antibody according to Table 1 and then incubated with a Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Goat anti-rabbit A4914 from SIGMA-ALDRICH and Horse anti-mouse from Vector Laboratories. Finally, the peroxidase activity was revealed with the ECL detection kit and visualized with Hyperfilm™ ECL™ (AMERSHAM/GE HEALTHCARE).

Cell Fractionation into Cytosol and Microtubule Fractions

After treatments, an equivalent number of mock and 4RTau overexpressing cells was recovered at 37°C in equal volumes of warmed lysis buffer (80 mM Pipes, pH 6.8, 1mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 30% glycerol, 0.1% Triton X-100) with protease inhibitors and okadaic acid. After ultracentrifugation (100,000 g at 21 °C) for 30 min, supernatants were collected as cytosolic fractions. The remaining pellets were resuspended by sonication in ice-cold

modified RIPA buffer with protease inhibitors and okadaic acid and homogenized for 1 hour at 4°C, in a volume equal to that of cytosolic fractions and then centrifuged at 12,000 g (4°C) for 20 min. Supernatants were recovered as microtubule fractions. Protein concentration was determined using the BCA assay Kit (PIERCE, Rockford, IL, USA) and samples were then mixed to LDS buffer containing a reducing agent (INVITROGEN) and boiled at 100 °C for 5 min; equivalent volumes from a equal cell number were loaded on SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting.

Tau dephosphorylation *In Vitro*

After 48 hours of tetracycline induction, cells were harvested into an ice-cold NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP-40) supplemented with protease inhibitors. Amount of total proteins was determined using the BCA kit and 100 µg of total proteins were incubated at 37°C, for 80 minutes with λ-protein phosphatase in reaction buffer (2 mM MgCl₂, NEB reaction buffer 1X) as recommended by the manufacturer (New England Biolabs, Ozyme, France) [13]. Dephosphorylation was stopped on ice and *In Vitro* dephosphorylated products were immediately mixed to LDS Sample Buffer for 1D analysis or dissolved in a 2D electrophoresis buffer for 2D analysis, as previously described.

Results

Characterisation of stable inducible SH-SY5Y over expressing 4RTau

In previous studies, we showed that, compared to 3RTau, overexpression of 4RTau increased susceptibility of SH-SY5Y neuroblastoma cells to cell death [14]. Moreover, during SY5Y differentiation, neuritic processes formation is dependent on microtubule dynamic. Then, to avoid both 4RTau toxicity and interference of 4RTau with SY5Y differentiation, we undertook establishment of stable cell lines using an inducible system. As shown in Fig.2A, at low exposure, endogenous Tau immunoreactivity was not observed. Conversely, in non-induced 4RTau cell lines (0h of tetracycline induction), a low basal expression of exogenous Tau proteins due to a leak of the inducible expression system, was observed. However, after 24 to 48 hours of tetracycline induction, we observed a 4RTau expression level which raised a 4 (WT Tau and P301S Tau) to 6-fold (S305N Tau) increase after 48 hours of tetracycline induction (Fig.2B). Due to previous data showing that 4RTau overexpression increased susceptibility of SH-SY5Y neuroblastoma cells to cell death [14], we performed an LDH assay to determine the time-laps that allows analysis without any interferences of cell death. Measurement of lactate dehydrogenase (LDH) release did not show any toxic effect of all transgenes until 48 hours of tetracycline induction. However, a small increase of LDH release was observed after 72 hours of induction in all cell lines.

Analysis of FTDP-17 mutations effects on Tau-microtubule network

FTDP-17 mutations have been classified regarding their functional effects on microtubule polymerisation *in vitro* [15, 16]. Moreover, we have previously confirmed these functional

effects in an *in vivo* assay by analysing *Xenopus Laevis* oocyte maturation [11]. In this regard, we herein assessed functional consequences in our SH-SY5Y models of two FTDP-17 mutations (P301S and S305N) known to have opposite effects on microtubule binding. First, we performed cell fractionation into cytosol fraction which contains free Tau and Microtubule fraction which contains the microtubule associated Tau as assessed by acetyl- α -tubulin immunoreactivity [12]. Analysis of these fractions was performed by immunoblotting (Fig.3) and immunoreactivity of Tau in each fraction was quantified. Representation of Tau immunoreactivity distribution as percentage of each fraction (Fig.3B) revealed that majority of Tau proteins (60%) were not bound to microtubules at 24 hours of tetracycline induction in WT Tau cell line. Analysis of mutated 4RTau repartition in P301S and S305N cell lines at 24 and 48 hours of tetracycline treatment did not show any significant difference in comparison to WT ones. Moreover, P301S and S305N 4RTau showed a similar repartition profile even after 48 hours of transgenes induction.

To determine the cellular consequences of this Tau repartition, we analysed microtubule network of differentiated cells (Fig.4) by immunocytochemistry assays. Analysis of acetyl- α -tubulin staining (Fig.4B, E, H and K) in both WT 4RTau and mutant 4RTau cell lines, revealed that we observed a drastic remodelling of cell cytoskeleton characterised by appearance of specific features which were called “bundles” (Fig.4M to O white arrows). However, these characteristic figures are never observed in mock cells. Beside that, analysis by confocal microscopy showed that WT 4RTau and mutant 4RTau proteins totally co-localised with these bundles (Fig.4F, I and L), as can be viewed at higher magnification (Fig.4M, N and O).

Altogether, these data seem to show, in our cell system, that we did not observe any effects of mutated 4RTau in comparison to WT 4RTau. Moreover, in our cell system, we did not reveal any differences between P301S and S305N mutants regarding microtubule function.

Tau aggregation analysis by electronic microscopy

The second main key feature of Tau pathology is characterised by Tau aggregates. To date, no cellular model have shown Tau aggregates similar to Paired-Helical Filaments observed in pathological human brains or Tau transgenic mice. To assess “pathological” consequences of Tau mutations in a human neuronal cell context, lysates from differentiated cells were analysed by immunogold labeling electron microscopy. Results obtained showed a Tau labeling which is only “clustered” on opaque structures, in mutant 4RTau cell lines (Fig.5C and D: black arrows). These structures are specific to mutated 4RTau cell lines since they are never observed neither in Mock or WT 4RTau cell lines. However, as previous cellular models described, these structures do not look like PHFs, suggesting that just a starting point of Tau nucleation could be observed in our cell system.

Analysis of Tau phosphorylation

To analyse mutations effects on Tau phosphorylation, we monitored Tau phosphorylation by two approaches. First, a classical approach of 1D gel electrophoresis and immunoblotting of some phosphorylation epitopes found dysregulated in Tau pathology was done (Fig.6). Analysis of AT270, AT180 and 12E8 epitopes showed no immunoreactivity increase in mutated 4RTau cell lines in comparison to WT ones but rather a decrease in phosphorylation which is more important for AT180 and 12E8 epitopes. Beside that, immunoblots with

antibodies directed against abnormal phosphorylation sites did not show any Tau abnormal phosphorylation (Data not shown) in all cell lines even after 48 hours of tetracycline induction.

To further investigate Tau global phosphorylation state, we performed 2D electrophoresis followed by an immunostaining with Tau-exon10 antibody to reveal total exogenous 4RTau (Fig.7A). Analysis of 2D electrophoresis immunoblotting revealed about 10 species of Tau isovariants which are distributed on three molecular weight levels for the most acidic ones (for both WT and mutated 4RTau). Besides that, isovariants for both P301S and S305N mutations are found proportionally at higher isoelectric point (pI) than WT 4RTau isovariants. More interestingly, we observed that P301S and S305N isovariants displayed a higher molecular weight than WT ones at basic pI. This shift, characterised by an increase in isovariants number of mutated 4RTau on high molecular weight levels (Fig.7A: black arrows) and associated to a decrease of mutated 4RTau isovariants on low molecular weight levels, is indicative of a significant difference between WT and mutated 4RTau.

In vitro Tau dephosphorylation

To determine whether Tau phosphorylation was responsible for the molecular weight “shift” of mutated Tau isovariants, we performed *in vitro* Tau dephosphorylation by λ -phosphatase. To control efficiency of this dephosphorylation we, first, performed a classical approach of 1D-electrophoresis followed by immunoblotting with antibodies directed against different phosphoepitopes. As shown in Fig.7C, we observed a complete dephosphorylation at AD2 epitope after treatment with λ -phosphatase. Beside that, immunoblot with a total Tau antibody revealed a thin “down shift” of mutated 4RTau treated with λ -phosphatase in 1D (compared

to untreated ones). This “down shift” is also observed for dephosphorylated WT 4RTau, but to a lesser extent.

Analysis of dephosphorylated Tau by 2D-electrophoresis and immunoblotting with exon10 antibody showed that all isovariants for both WT and mutated 4RTau are displaced to high basical pI (Fig.7B in comparison to none dephosphorylated ones (Fig.7A). More importantly, we observed that the molecular weight “shift” of mutated 4RTau isovariants described above, is completely abolished after treatment by λ -phosphatase. Altogether, these data proved clearly that, compared to WT 4RTau, mutated 4RTau displayed a difference in phosphorylation pattern which is responsible for a substantial molecular weight “shift”.

Discussion

FTDP-17 mutations have been at the starting point of modelling Tau aggregation *in vivo*. However, almost all studies achieved in cell models fail to elucidate physiopathological mechanisms underlying Tau aggregation. Here, we report a new model overexpressing either WT or mutated 4RTau bearing two FTDP-17 mutations to investigate molecular events which trigger Tau aggregation in a “neuronal like” cell context. Those mutations were reported as having opposite effects regarding microtubule binding [11, 15, 16] and hence we chose an inducible system to avoid interferences of transgenes overexpression with differentiation process. Analysis of microtubule network in all 4RTau cell lines show a drastic microtubule network remodelling with appearance of characteristic features of stacking microtubules so called “Bundles” in agreement with several studies [17-21]. More importantly, we did not observe, by cytosol/microtubule fractionation, any proper effects of both mutations on microtubule binding since WT 4RTau showed the same results. These data suggest that the expected effect of mutations is masked by overexpression of 4RTau that is known to display a high capacity to bind microtubules in differentiated neuroblastoma cells. That may blocks microtubule dynamic and then induces “bundles” formation itself. Indeed, on the one hand, introducing S305N mutation (known to increase Tau-microtubule binding) does not show any adding effect because of the high intrinsic effect of WT 4RTau to bind microtubules. On the other hand, introducing P301S mutation, with an opposite effect, is likely not sufficient to abolish this binding capacity of 4RTau and therefore does not induce any 4RTau delocalization from microtubule to cytosol. These results confirm previous studies of Lu and Kosik who shown mutation effects on microtubule binding only when FTDP-17 mutants 4RTau are co-expressed with WT 4RTau. Moreover, these authors shown that WT 4RTau co-expressed with WT 3RTau is able to displace WT 3RTau from microtubule to cytosol [22]

suggesting that in our model, 4RTau is responsible for this “bundle” phenotype independently of borne mutation. Finally, we observed that majority of Tau (in excess) accumulates in cytosol. As this accumulation is considered as a first step of Tau aggregation in “the Tangle Hypothesis” [23], we undertook analysis of Tau aggregation by an electron microscopy approach in our models. The lack of a tangle like pathology, as observed in transgenic mice models, confirms results from a long list of previous models which have never clearly shown the existence of such filaments in heterologous and human cells. However, as described in neuroglioma H4 cells [17], we observed some Tau clustering structures which could correspond to very early starting points of Tau nucleation. These data likely suggest that some additional factors could be involved in Tau aggregation and then would be required to trigger the whole tangle pathology.

Moreover, abnormal phosphorylation was not detected in our model and analysis of some major phosphoepitopes by a classical approach of immunoblotting of 1D SDS-PAGE revealed either no increase or a decrease of mutants 4RTau phosphorylation at some epitopes. These data are coherent with previous studies which report non significant increase (for review [10]) or a decrease of Tau phosphorylation for some FTDP-17 Tau mutants such as R406W mutation [11, 24]. To further study Tau modifications, we report in the present a new analysis approach of Tau phosphorylation by 2D electrophoresis. This kind of approach revealed that FTDP-17 mutated 4RTau were differentially phosphorylated than WT 4RTau. This difference in phosphorylation is characterised by a basic Tau isoforms which confirm, in our cell system, that mutants 4RTau are globally less phosphorylated. More importantly, mutated 4RTau isoforms showed a different 2D-migration pattern characterised by a migration delay of mutated Tau in SDS PAGE which is abolished following dephosphorylation. This “shift” could be due to specific mode of Tau phosphorylation so called “mode I” described by Lindwall and col. [25]. In this study, authors suggested, as described before for Histone H1

[26], that some unphosphorylated Tau contains domains resistant to SDS which remain under a folded state and migrate rapidly in SDS electrophoresis. Phosphorylation of a cluster of epitopes located in these domains could lead to conformational changes and to unfolding of these domains responsible for appearance of a “longer” Tau form which could migrate slower in SDS-PAGE.

Altogether, our data suggest that P301S and S305N 4RTau mutants exist under a particular phosphorylation state. Moreover, this work brings a new insight on Tau phosphorylation. Bi-dimensional analysis suggests that site-specific phosphorylation needs further complementary analysis. More importantly, Tau mutations may both change distribution of phosphate groups and generate “clusters of phosphorylation” by differential accessibility to kinases/phosphatases. Finally, this work could raise a common mechanism for several FTDP-17 mutations such as R406W mutation which could act through the dysregulation of Tau phosphorylation ultimately leading to conformational changes. However, we cannot exclude the fact that mutations themselves induce some conformational changes responsible for a differential accessibility to kinases/phosphatases which lead, in turn, to a difference in Tau phosphorylation state. Besides that, appearance of structures of Tau nucleation associated to these conformational changes suggest that our model show a very early step in the tangle pathology time course and will be very useful to identify other factors which are needed to trigger the whole Tangle pathology.

Acknowledgements

These studies were supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), University of Lille 2, the European Community (APOPIS), Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC), the Gis Longévité and the F.E.D.E.R. A. Bretteville and K. Ando are recipients of a scholarship from Lille County Hospital (CHRU-Lille)/Région Nord/Pas-de-Calais and Foreign Affairs Ministry respectively. K. Schindowski is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Bibliography

- [1] K. Schindowski, A. Bretteville, K. Leroy, S. Begard, J.P. Brion, M. Hamdane, L. Buee, Alzheimer's disease-like Tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated Tau transgenic mouse without any motor deficits, *Am J Pathol* 169 (2006) 599-616.
- [2] K. Boekhoorn, D. Terwel, B. Biemans, P. Borghgraef, O. Wiegert, G.J. Ramakers, K. de Vos, H. Krugers, T. Tomiyama, H. Mori, M. Joels, F. van Leuven, P.J. Lucassen, Improved long-term potentiation and memory in young Tau-P301L transgenic mice before onset of hyperphosphorylation and Tauopathy, *J Neurosci* 26 (2006) 3514-3523.
- [3] D. Terwel, R. Lasrado, J. Snauwaert, E. Vandeweert, C. Van Haesendonck, P. Borghgraef, F. Van Leuven, Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund Tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice, *J Biol Chem* 280 (2005) 3963-3973.
- [4] K. Santacruz, J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, A. Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton, K.H. Ashe, Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function, *Science* 309 (2005) 476-481.
- [5] B. Allen, E. Ingram, M. Takao, M.J. Smith, R. Jakes, K. Virdee, H. Yoshida, M. Holzer, M. Craxton, P.C. Emson, C. Atzori, A. Migheli, R.A. CroWTher, B. Ghetti, M.G. Spillantini, M. Goedert, Abundant Tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S Tau protein, *J Neurosci* 22 (2002) 9340-9351.
- [6] J. Gotz, L.M. Ittner, N. Schonrock, Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: prospects of a tailored therapy?, *Med J Aust* 185 (2006) 381-384.

- [7] I. Khlistunova, J. Biernat, Y. Wang, M. Pickhardt, M. von Bergen, Z. Gazova, E. Mandelkow, E.M. Mandelkow, Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of Tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs, *J Biol Chem* 281 (2006) 1205-1214.
- [8] A.I. Iliev, S. Ganesan, G. Bunt, F.S. Wouters, Removal of Pattern-breaking Sequences in Microtubule Binding Repeats Produces Instantaneous Tau Aggregation and Toxicity, *J Biol Chem* 281 (2006) 37195-37204.
- [9] M. Perez, F. Hernandez, A. Gomez-Ramos, M. Smith, G. Perry, J. Avila, Formation of aberrant phosphoTau fibrillar polymers in neural cultured cells, *Eur J Biochem* 269 (2002) 1484-1489.
- [10] L.W. Ko, M. DeTure, N. Sahara, R. Chihab, I.E. Vega, S.H. Yen, Recent advances in experimental modeling of the assembly of Tau filaments, *Biochim Biophys Acta* 1739 (2005) 125-139.
- [11] P. Delobel, S. Flament, M. Hamdane, R. Jakes, A. Rousseau, A. Delacourte, J.P. Vilain, M. Goedert, L. Buee, Functional characterization of FTDP-17 Tau gene mutations through their effects on *Xenopus* oocyte maturation, *J Biol Chem* 277 (2002) 9199-9205.
- [12] M. Hamdane, A.V. Sambo, P. Delobel, S. Begard, A. Violleau, A. Delacourte, P. Bertrand, J. Benavides, L. Buee, Mitotic-like Tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex, *J Biol Chem* 278 (2003) 34026-34034.
- [13] D.P. Hanger, G.M. Gibb, R. de Silva, A. Boutajangout, J.P. Brion, T. Revesz, A.J. Lees, B.H. Anderton, The complex relationship between soluble and insoluble Tau in Tauopathies revealed by efficient dephosphorylation and specific antibodies, *FEBS Lett* 531 (2002) 538-542.

- [14] P. Delobel, C. Mailliot, M. Hamdane, A.V. Sambo, S. Begard, A. Violleau, A. Delacourte, L. Buee, Stable-Tau overexpression in human neuroblastoma cells: an open door for explaining neuronal death in Tauopathies, *Ann N Y Acad Sci* 1010 (2003) 623-634.
- [15] M. Hasegawa, M.J. Smith, M. Goedert, Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly, *FEBS Lett* 437 (1998) 207-210.
- [16] M. Hasegawa, M.J. Smith, M. Iijima, T. Tabira, M. Goedert, FTDP-17 mutations N279K and S305N in Tau produce increased splicing of exon 10, *FEBS Lett* 443 (1999) 93-96.
- [17] M. DeTure, L.W. Ko, C. Easson, S.H. Yen, Tau assembly in inducible transfectants expressing wild-type or FTDP-17 Tau, *Am J Pathol* 161 (2002) 1711-1722.
- [18] E.W. Nagiec, K.E. Sampson, I. Abraham, Mutated Tau binds less avidly to microtubules than wildtype Tau in living cells, *J Neurosci Res* 63 (2001) 268-275.
- [19] T.G. Mack, R. Dayanandan, M. Van Slegtenhorst, A. Whone, M. Hutton, S. Lovestone, B.H. Anderton, Tau proteins with frontotemporal dementia-17 mutations have both altered expression levels and phosphorylation profiles in differentiated neuroblastoma cells, *Neuroscience* 108 (2001) 701-712.
- [20] V. Vogelsberg-Ragaglia, J. Bruce, C. Richter-Landsberg, B. Zhang, M. Hong, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, Distinct FTDP-17 missense mutations in Tau produce Tau aggregates and other pathological phenotypes in transfected CHO cells, *Mol Biol Cell* 11 (2000) 4093-4104.
- [21] R. Dayanandan, M. Van Slegtenhorst, T.G. Mack, L. Ko, S.H. Yen, K. Leroy, J.P. Brion, B.H. Anderton, M. Hutton, S. Lovestone, Mutations in Tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation, *FEBS Lett* 446 (1999) 228-232.

- [22] M. Lu, K.S. Kosik, Competition for microtubule-binding with dual expression of Tau missense and splice isoforms, *Mol Biol Cell* 12 (2001) 171-184.
- [23] G.F. Hall, J. Yao, Modeling Tauopathy: a range of complementary approaches, *Biochim Biophys Acta* 1739 (2005) 224-239.
- [24] M. Perez, F. Lim, M. Arrasate, J. Avila, The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated Tau with microtubules, *J Neurochem* 74 (2000) 2583-2589.
- [25] G. Lindwall, R.D. Cole, The purification of Tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of Tau in brain, *J Biol Chem* 259 (1984) 12241-12245.
- [26] P.C. Billings, J.W. Orf, D.K. Palmer, D.A. Talmage, C.G. Pan, M. Blumenfeld, Anomalous electrophoretic mobility of *Drosophila* phosphorylated H1 histone: is it related to the compaction of satellite DNA into heterochromatin?, *Nucleic Acids Res* 6 (1979) 2151-2164.
- [27] V. Buee-Scherrer, O. Condamines, C. Mourton-Gilles, R. Jakes, M. Goedert, B. Pau, A. Delacourte, AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against Tau proteins found in Alzheimer's disease, *Brain Res Mol Brain Res* 39 (1996) 79-88.
- [28] P. Seubert, M. Mawal-Dewan, R. Barbour, R. Jakes, M. Goedert, G.V. Johnson, J.M. Litsky, D. Schenk, I. Lieberburg, J.Q. Trojanowski, et al., Detection of phosphorylated Ser262 in fetal Tau, adult Tau, and paired helical filament Tau, *J Biol Chem* 270 (1995) 18917-18922.
- [29] N. Sergeant, B. Sablonniere, S. Schraen-Maschke, A. Ghestem, C.A. Maurage, A. Wattez, P. Vermersch, A. Delacourte, Dysregulation of human brain microtubule-associated Tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1, *Hum Mol Genet* 10 (2001) 2143-2155.

- [30] C. Mailliot, V. Podevin-Dimster, R.E. Rosenthal, N. Sergeant, A. Delacourte, G. Fiskum, L. Buee, Rapid Tau protein dephosphorylation and differential rephosphorylation during cardiac arrest-induced cerebral ischemia and reperfusion, *J Cereb Blood Flow Metab* 20 (2000) 543-549.

Figure legends

Table 1: **Antibodies used in the present study.**

Figure 1: **Schematic representation of full-length Human 4-Repeat Tau (4RTau) 46 with 412 amino acids (exon 2+, 3-, 10+).** Alternative exons included are symbolised by grey boxes and microtubule tandem-repeat by hatched blocks. Mutated amino-acids are indicated (underlined letter). Transgenes expression is under a *Cytomegalovirus* immediate-early Promoter and 2 Tetracycline operator sites (2X TetOp) provided by mammalian expression vector pcDNA4/TO©.

Figure 2: **Comparative analysis of transgenes expression in 4RTau cell lines and evaluation of transgenes toxicity.** A) Lysates from Mock and 4RTau inducible cells, treated or not (0) with tetracycline for 24 to 48 hours were immunolabeled with TauCter 1902 (Total Tau), and β -actin as loading control. B) Quantification of Tau expression levels in 4RTau cell lines: Ratios of densitometric values of TauCter 1902 immunoreactivity to those of β -actin are presented. These ratios are normalized to those obtained from WT 4RTau cells after 48 hours tetracycline (arbitrary value = 1). C) Evaluation of transgenes toxicity by LDH release measurement. Spontaneous LDH release as percentages of Total LDH is represented. Values of tetracycline treated-cells have been normalised for each cell line to those of untreated ones.

Figure 3: **Analysis of mutations effects on Tau distribution between microtubule and cytosol fractions.** A) Representative immunoblot of Tau distribution in microtubule (M) and cytosol (C) fractions in 4RTau cell lines treated with tetracycline for 24 and 48 hours. Fractionation quality was assessed by immunoblotting lysates with antibody directed against

acetyl- α -tubulin (polymerised form of tubulin found in microtubule). B) Densitometric analysis of Tau immunoreactivities in each fraction represented as percentage of total Tau fraction.

Figure 4: Analysis of WT and mutant 4RTau overexpression effects on cytoskeleton organization. Differentiated cells treated with tetracycline for 24 hours were immunolabeled with Total Tau antibody: TauCter 1902 (A,D,G and J) and acetyl- α -tubulin antibody (B,E,H and K). Nucleus staining was obtained by TO-pro3 staining (not shown alone). Composed images are presented (C,F,I and L) and higher magnifications of representative area are shown (M to O). Characteristic cytoskeleton remodelling called “bundles” are indicated by white arrows.

Figure 5: Analysis of Tau aggregation by electronic microscopy and Gold-immunolabeling. Differentiated Mock and 4RTau cell lines lysates after 48 hours of tetracycline induction were subjected to immunogold labelling with TauCter 1902 (Total Tau) antibody and revealed by colloidal gold (18 nm) labeled goat anti-rabbit immunoglobulins. Images were obtained at high magnification: 20 000X. “Clustering” of Tau immunoreactivity is indicated by black arrows.

Figure 6: Analysis of Tau phosphorylation in 4RTau cell lines by western blotting. Representative immunoblots analyses were shown. Differentiated cell lysates treated or not (0 hours) with tetracycline for 6 to 24 hours were analysed by phosphorylation dependent antibodies: AT180, 12E8, AT270. Total amount of Tau proteins loaded is visualized with TauCter 1902 antibody (Total Tau) antibody and β -actin was used as loading control.

Figure 7: Analysis of Tau phosphorylation in 4RTau cell lines by bi-dimensional electrophoresis. A) Bi-dimensional analysis of WT and Mutated P301S or S305N 4RTau. Differentiated cells treated with tetracycline for 48 hours were subjected to 2D analysis and immunoblotted with Tau Exon10 (E10) antibody (4RTau specific). Alignments of immunoblots were performed by alignment of none specifically products revealed by secondary antibody (dotted lines). Different molecular weight levels of Tau isoforms are represented by short dashed lines and pI indicators (obtained with an internal IEF control) by long and short mixed dashed lines. B) Bi-dimensional analysis of WT and Mutated 4RTau after *in vitro* Tau dephosphorylation followed by immunoblotting with Tau exon10 (E10) antibody (4RTau specific). C) Immunoblot analysis of *in vitro* dephosphorylated WT and mutated (P301S and S305N) 4RTau. Differentiated cells treated with tetracycline for 48 hours were subjected (+) or not, to an *in vitro* dephosphorylation by λ -phosphatase and immunoblotted by phosphorylation dependent antibody. Total amount of Tau proteins loaded is visualized with TauCter 1902 antibody (Total Tau) and β -actin was used as loading control.

Table 1

Western Blotting					IF	MET	References
Antibody	Species	blocking	Specificity	Dilution	Dilution	Dilution	
AD2	Mouse	TBST*+ 5% skim Milk	Tau; pSer396	1:20 000			[27]
AT180	Mouse	TBST	Tau; pT231	1:1 000			Innogenetics, Belgium
AT270	Mouse	TBST	Tau; pT181	1:4 000			Innogenetics
12E8	Mouse	TBST	Tau; pS262-pS356	1:4 000			[28]
M19G	Rabbit	TBST*+ 5% skim Milk	Tau ; human specific	1:20 000	1: 2 000		[27]
TauCter 1902	Rabbit	TBST*+ 5% skim Milk	Total Tau	1:4 000		1:1 000	[29]
Tau Exon10 (E10)	Rabbit	TBST*+ 5% skim Milk	Total 4RTau	1:4 000			[30]
acétyl- α -tubulin clone 6-11B-1	Mouse	TBST+ 5% skim Milk	polymerised acétyl- α -tubulin	1:6 000	1: 600		Sigma-Aldrich, France
β -actine	Mouse	TBST*+ 5% skim Milk		1:50 000			Sigma-Aldrich
*TBST	Tris-buffered saline, pH 8, 0.05% Tween 20						

Figure 1

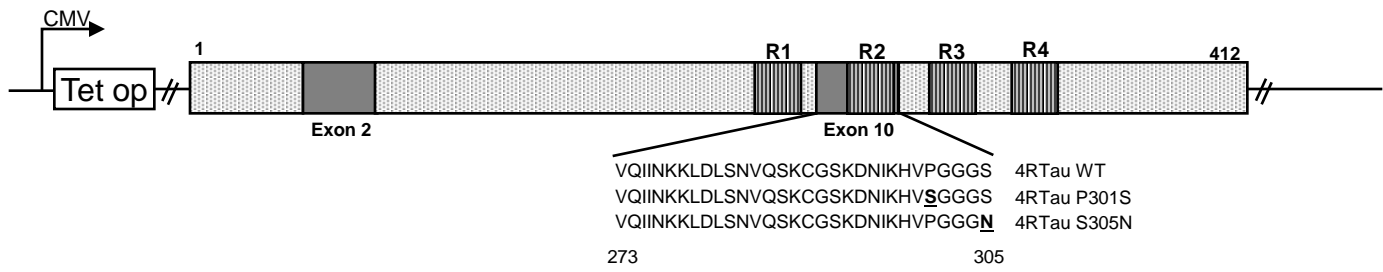


Figure 2

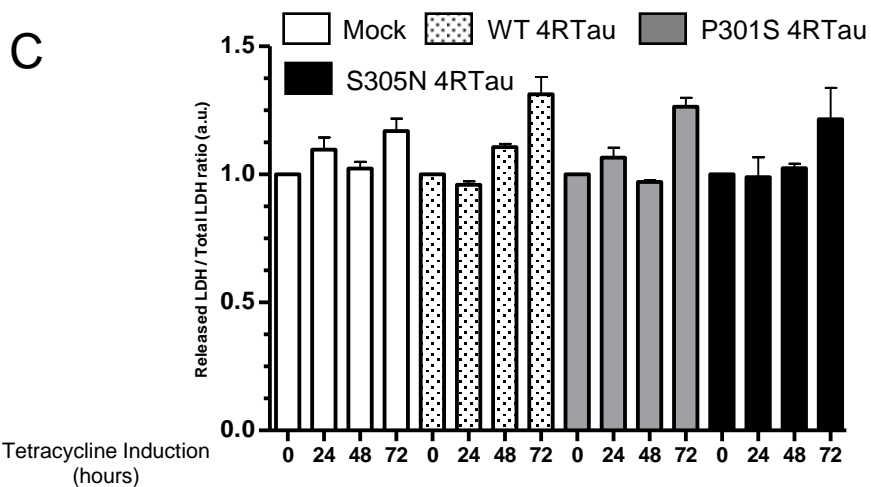
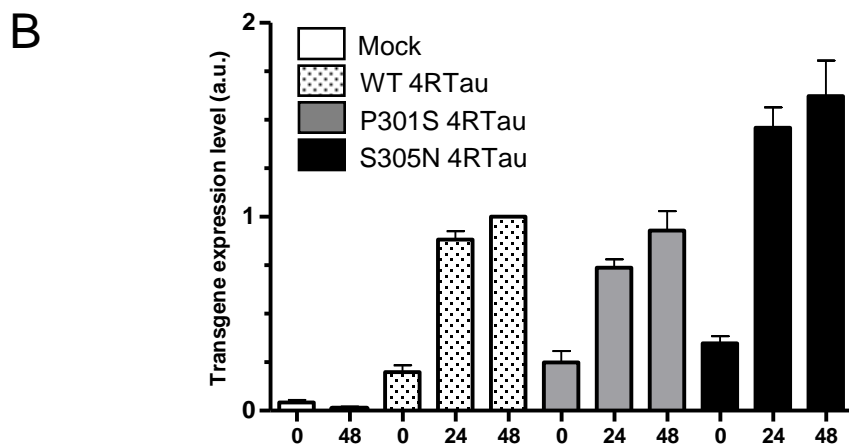
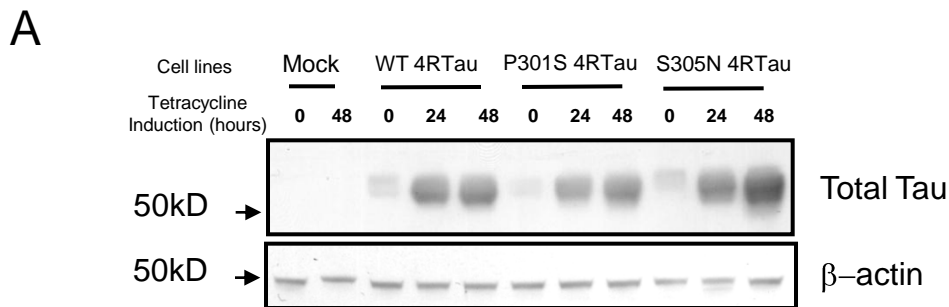
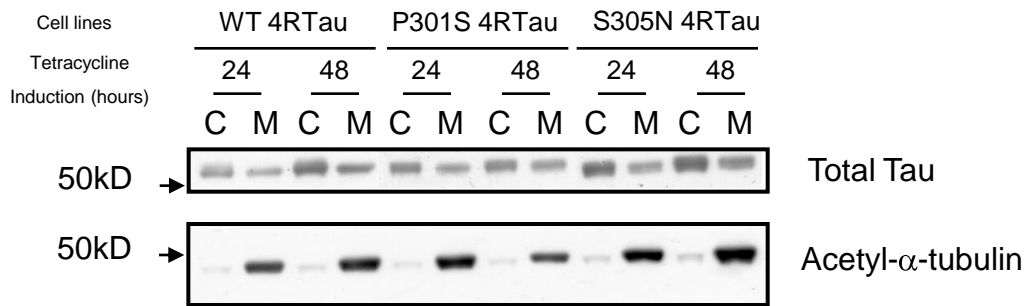


Figure 3

A



B

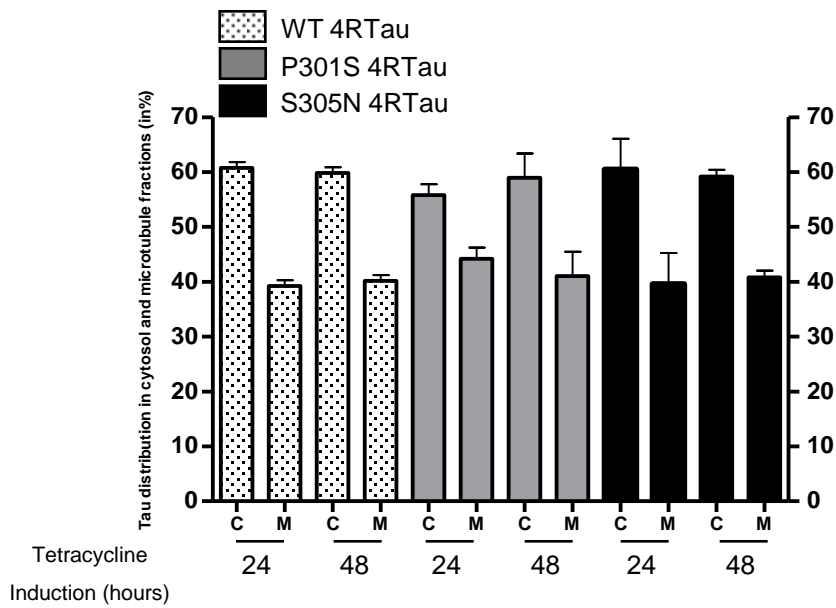


Figure 4

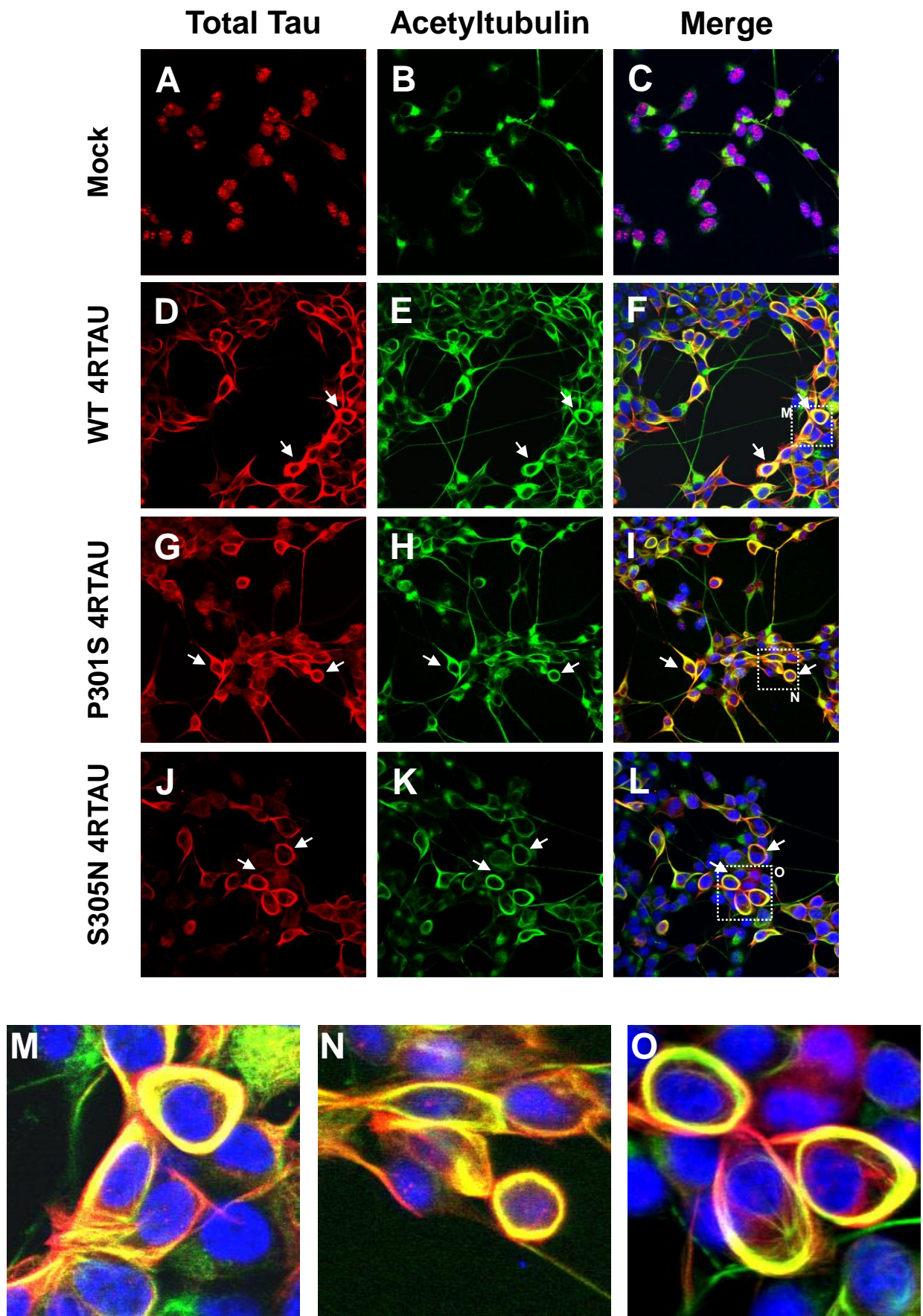


Figure 5

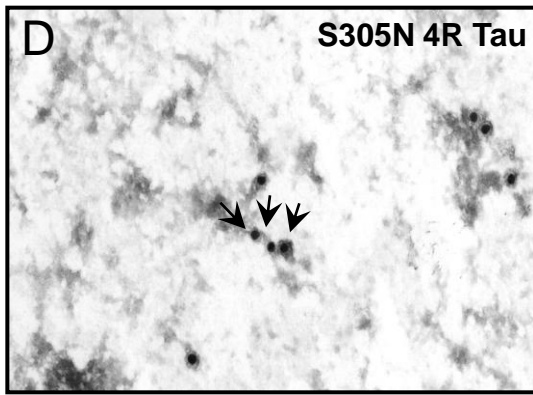
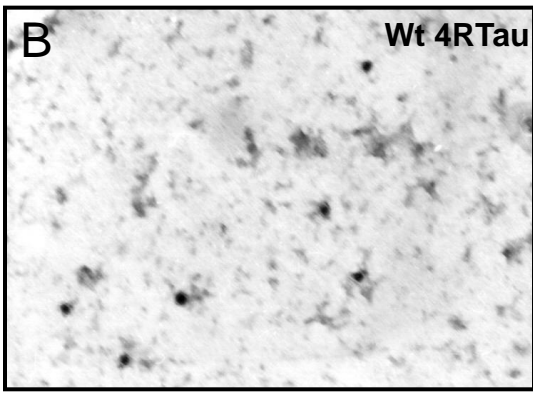
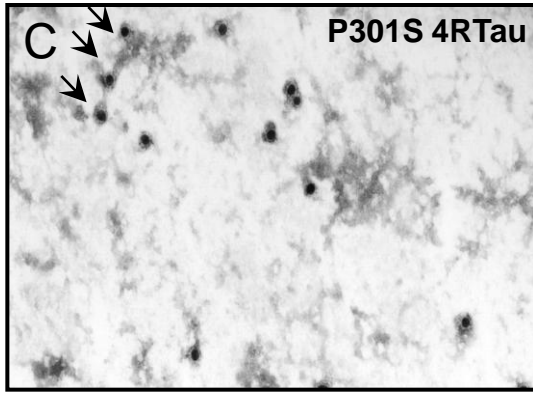
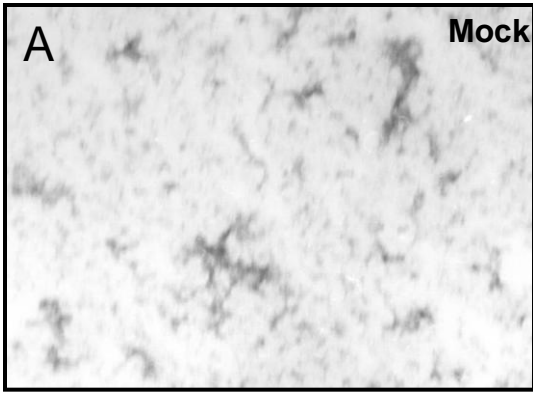


Figure 6

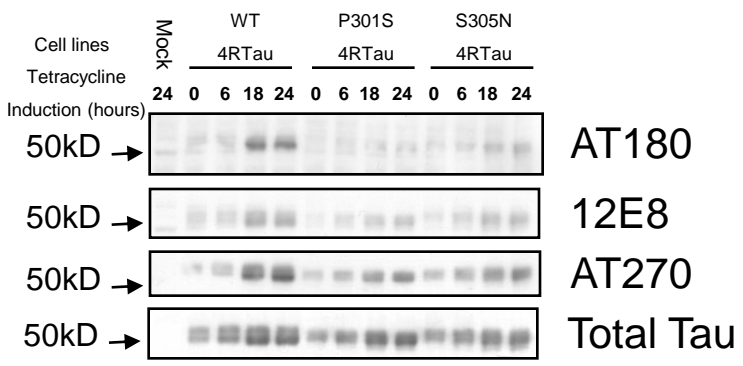
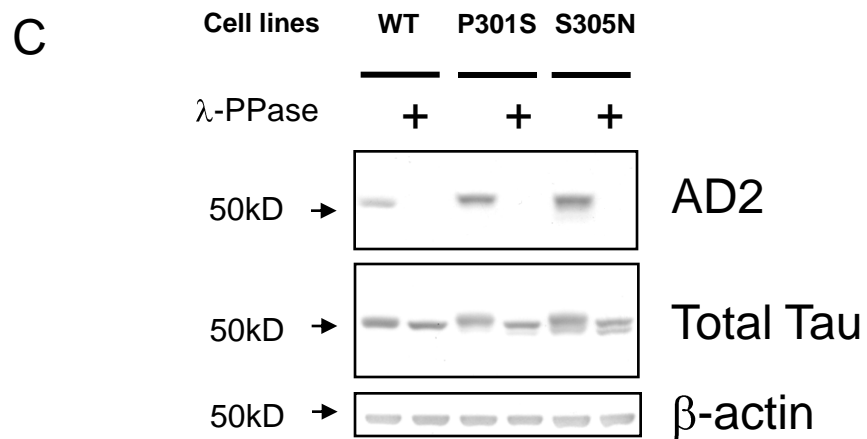
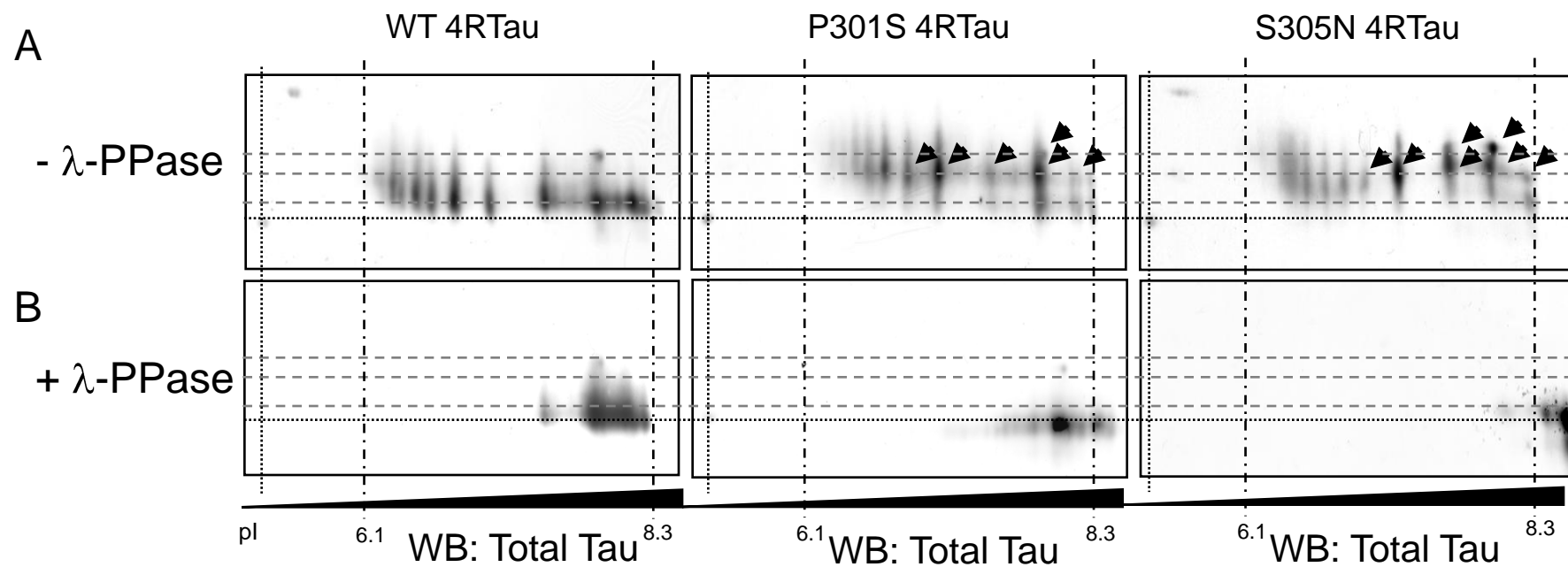


Figure 7



2.1.3 Conclusions

2.1.3.1 Conception du modèle

Le travail présenté ici, a permis le développement et la caractérisation de trois lignées cellulaires SH-SY5Y. Ces lignées surexpriment de façon stable la protéine Tau 4R sauvage (lignée témoin) ou des protéines Tau 4R comportant une mutation DFTP-17 (P301S ou S305N) (Figure 1 de l'article). D'autre part, le choix de plasmides permettant une expression inductible des transgènes (pcDNA4/TO) ainsi qu'une sélection appropriée des clones d'intérêts nous ont permis d'obtenir des lignées où l'expression des transgènes était faible en condition basale et augmentée de 4 à 6 fois après 24 et 48 heures de traitement avec l'agent inducteur tétracycline (Figure 2A, 2B du manuscrit). Ce paramètre était en effet un pré-requis pour mener à bien notre étude dans un modèle cellulaire différencié et éviter toute perturbation de la différenciation cellulaire (dépendante de la dynamique microtubulaire) par la surexpression de Tau. Quant au choix des mutations, il repose sur des études *in vitro* (Hasegawa *et al.*, 1998; Hasegawa *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 1998) et une étude du laboratoire menée dans l'ovocyte de Xénope (Delobel *et al.*, 2002b) qui avaient montré que ces deux mutations avaient des effets opposés vis-à-vis de la liaison de Tau aux microtubules. Ainsi, l'analyse comparative de ces deux mutations nous a permis d'étudier les effets des mutations sur la phosphorylation de Tau et son agrégation indépendamment de leur effet à moduler la capacité de Tau à lier les microtubules.

2.1.3.2 Mutations de Tau et Réseau microtubulaire

En premier lieu, l'analyse de l'effet des mutations sur le réseau microtubulaire a été envisagée par deux approches complémentaires dans nos modèles SH-SY5Y. Tout d'abord une approche biochimique, après séparation des fractions microtubulaire et cytosolique, nous a permis de montrer que la majorité des protéines Tau mutées, comme la protéine Tau sauvage, se retrouvait dans le cytosol. De plus, dans notre modèle cellulaire, nous n'avons pas pu montrer d'effet propre des mutations sur la répartition de Tau entre le compartiment microtubulaire et cytosolique (Figure 3 du manuscrit). Ensuite, une approche morphologique du réseau microtubulaire réalisée par immunohistochimie, nous a révélé que ce dernier subissait un remodelage important avec l'apparition de structures caractéristiques de regroupements de microtubules appelés « Bundles ». Ce remodelage est néanmoins observé

dans toutes les lignées, qu'elles surexpriment des protéines Tau sauvages ou mutées (Figure 4 du manuscrit).

L'analyse combinée de ces résultats suggère ainsi, dans nos modèles, que la surexpression de la protéine Tau 4R, à elle seule, est capable d'entraîner des modifications importantes du réseau microtubulaire et ceci indépendamment des mutations. Ces résultats confirment les données de la littérature, qui montrent que dans un contexte de surexpression simple, dans des modèles cellulaires, on ne détecte pas de différence entre les protéines Tau mutées et les protéines Tau sauvages à lier les microtubules (cf. §3.2.1.2, p.53).

2.1.3.3 Mutations de Tau et caractéristiques pathologiques

2.1.3.3.a Phosphorylation

L'analyse de la phosphorylation a été abordée par deux approches différentes. En premier lieu, nous avons analysé la phosphorylation de Tau par une analyse monodimensionnelle suivie d'une immunoempreinte de certains épitopes de phosphorylation de Tau dérégulés dans les Tauopathies. Le résultat de ces analyses ne montre pas l'existence d'une phosphorylation anormale de Tau (AT100, 988/AP422, TG3) dans nos modèles. L'analyse des épitopes AT270, 12E8 et AT180 ne révèle pas non plus d'augmentation de phosphorylation mais plutôt une diminution de phosphorylation aux épitopes 12E8 et AT180, dans les lignées exprimant les protéines Tau mutées, par comparaison à la lignée témoin exprimant la protéine Tau sauvage (Figure 6 du manuscrit). Ces données sont en accord avec certaines études précédemment publiées dans d'autres modèles cellulaires.

Cependant, et dans un second temps, nous avons abordé l'étude de la phosphorylation de manière globale grâce à l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle (2D). En effet, cette technique permet de séparer les différents isovariants de Tau en fonction de leur point isoélectrique. La phosphorylation apportant des charges négatives supplémentaires à la protéine, on observera l'apparition d'isovariants de points isoélectriques plus acides. Ce type de séparation, révélée par immunoempreinte au moyen d'anticorps dirigés contre la protéine Tau, indépendamment de son état de phosphorylation, permet ainsi une analyse exhaustive de ses différents isovariants. De façon intéressante, le résultat des analyses des électrophorèses 2D a permis de mettre en évidence l'existence d'un profil de migration différentiel particulier et spécifique des lignées exprimant les protéines Tau mutées. Ce profil de migration qui présente, dans les lignées mutées, des isovariants plus basiques que dans la lignée sauvage, est

principalement caractérisé par l'existence d'un retard de migration de certains isovariants des protéines Tau mutées (Figure 7 du manuscrit). Ce « shift » préalablement décrit pour d'autres protéines comme l'histone H1, suggère que des changements spécifiques de l'état de phosphorylation de Tau appelés phosphorylation de « mode I » sont associés à des changements de conformation (Lindwall and Cole, 1984b) qui seraient liés à la redistribution des groupements phosphates sur la molécule de Tau. Ces changements de conformation pourraient alors donner lieu à des formes de Tau plus relâchées et de masse moléculaire apparente plus importante. De plus, cette hypothèse a été confirmée, dans notre travail, par des expériences de déphosphorylation *in vitro* qui abolissent ce « shift » démontrant clairement qu'un changement de l'état phosphorylation de Tau, favorisé par les mutations, est à l'origine de ce retard de migration. Au vu de ces résultats, nous nous sommes demandés si ce changement de conformation était associé avec une agrégation de la protéine Tau.

2.1.3.3.b Agrégation

Pour aborder cette problématique nous avons décidé d'employer une approche ultra-structurale par l'utilisation de la microscopie électronique à transmission. Par cette étude, nous avons pu montrer qu'il n'existait pas d'agrégats de protéines Tau structurés sous la forme de filaments comme on peut les observer dans la pathologie humaine ou dans notre modèle murin. En revanche, nous avons pu, et uniquement dans les lignées surexprimant les Tau mutées, déceler l'existence de structures denses aux électrons et marquées par des anticorps dirigés contre la protéine Tau (Figure 5 du manuscrit). Ce type de structures précédemment décrites dans certains modèles cellulaires (DeTure *et al.*, 2002a) et *in vivo* (Sahara *et al.*, 2002) ont été décrits comme des points initiaux d'agrégation de Tau appelés « points de nucléation ».

En conclusion, ce travail nous a permis de montrer que les mutations de Tau étudiées, dans nos modèles cellulaires de type neuronal, étaient capables d'induire des changements particuliers de l'état de phosphorylation de Tau qui étaient associés à des changements de conformation et à l'existence de points initiaux de l'agrégation de Tau appelés « points de nucléation ». En outre, ce travail montre que les mutations, à elles seules, ne sont probablement pas capables de mener à l'ensemble des caractéristiques pathologiques moléculaires impliquées dans la DNF (hyperphosphorylation, phosphorylation anormale et formation de PHFs). De plus, au cours de la fenêtre d'étude (allant de 24 à 72 heures

d'induction), nous n'avons pas observé de toxicité cellulaire dans nos lignées exprimant des protéines Tau mutées. Ces données laissent penser que les modifications moléculaires mises en évidence dans ces modèles d'étude, se situent, d'un point de vue chronologique, en amont de cette cascade délétère, et que d'autres événements moléculaires seraient impliqués pour mener à la fibrillogenèse de Tau et à la mort neuronale. Nos modèles représentent ainsi des outils adéquats pour l'exploration de ces événements. Toutefois, nous envisageons également d'étudier la viabilité de nos lignées cellulaires exprimant les protéines Tau mutées, à plus long terme. En effet, des études récentes suggèrent, que des formes oligomériques de Tau qui pourraient être des intermédiaires aux formes agrégées de Tau seraient également responsables d'une toxicité cellulaire *in cellulo* (Ko *et al.*, 2007) et *in vivo* (Berger *et al.*, 2007). Ainsi, il est concevable d'émettre l'hypothèse que les formes particulières de Tau, identifiées dans nos lignées Tau mutées, pourraient, à long terme, aboutir à la formation de ces formes oligomériques et présenter une toxicité cellulaire.

2.2 Modèle de phosphorylation anormale

2.2.1 Objectifs

Si l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale de Tau sont deux points communs à l'ensemble des Tauopathies, leurs rôles respectifs dans l'agrégation de Tau et dans la mort neuronale restent encore à déterminer. Afin d'étudier l'impact de la dérégulation de la phosphorylation de Tau dans son agrégation et la mort neuronale, le laboratoire a développé un modèle cellulaire de phosphorylation anormale (Hamdane *et al.*, 2003b). Ce modèle est basé sur la surexpression de la protéine p25, l'activateur pathologique d'une kinase neuronale nommée Cdk5 et impliquée dans le processus neurodégénératif observé dans la MA (Lee *et al.*, 1999; Patrick *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 1998) et d'autres maladies neurodégénératives (Borghi *et al.*, 2002; Bu *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2003) (et pour revue (Cruz and Tsai, 2004). Dans des cellules SH-SY5Y différenciées, la surexpression de cet activateur conduit à la phosphorylation pathologique de Tau avec l'apparition spécifique de l'épitope TG-3 à la Thr231 de Tau après 24 heures de surexpression. De plus cette phosphorylation anormale de Tau, précède la mort cellulaire observée dans ce modèle, après 48 heures d'expression (Hamdane *et al.*, 2003b). Ces données ont été par ailleurs validées *in vivo* dans des modèles murins, où la surexpression de p25 conduit à l'hyperphosphorylation,

la phosphorylation anormale de Tau (Ahlijanian *et al.*, 2000; Cruz *et al.*, 2003; Plattner *et al.*, 2006) et à une mort neuronale (Cruz *et al.*, 2003).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés d'avantage aux mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire observée dans ce modèle, et plus particulièrement à la présence de marqueurs du cycle cellulaire dans un contexte de cellules différenciées. En effet, la réexpression de marqueurs de la transition G1/S et G2/M, dans des cellules neuronales post-mitotiques, semble être une caractéristique de la mort neuronale de la MA (Dranovsky *et al.*, 2001; McShea *et al.*, 1997; Vincent *et al.*, 1997; Vincent *et al.*, 1996; Vincent *et al.*, 1998) qui est également observée dans certains modèles *in vivo* de DNF (Andorfer *et al.*, 2003). De plus, certains sites de phosphorylation de Tau dérégulés dans la MA comme l'épitope TG-3, sont également retrouvés dans des cellules en mitose (Delobel *et al.*, 2002a; Pope *et al.*, 1994; Vincent *et al.*, 1996). L'ensemble de ces données a conduit à l'hypothèse d'une réactivation du cycle cellulaire dans les neurones en dégénérescence et à l'implication de kinases régulant le cycle cellulaire.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés, dans nos cellules SH-SY5Y/p25 différenciées présentant cette phosphorylation TG-3 de type mitotique, à approfondir les mécanismes de mort cellulaire et à étudier l'effet de la dérégulation de l'activité kinasique p25/Cdk5 sur les marqueurs du cycle cellulaire. En effet, la kinase Cdk5 (cdc2 neuronal like kinase) représentait un bon candidat puisque elle s'apparente à cdc2, une kinase qui intervient dans la régulation de la transition G2/M.

2.2.2 Résultats

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

Malika Hamdane, Alexis Bretteville, Anne-Véronique Sambo, Katharina Schindowski, Séverine Bégard, André Delacourte, Philippe Bertrand and Luc Buée (2005). **p25/ Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation an early event in neuronal cell death.** *J Cell Sci* 118, 1291-8.

p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death

Malika Hamdane¹, Alexis Bretteville^{1,*}, Anne-Véronique Sambo^{1,*}, Katharina Schindowski², Séverine Bégard¹, André Delacourte¹, Philippe Bertrand² and Luc Buée^{1,‡}

¹INSERM U422, Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, Université de Lille 2, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

²Aventis Pharma, CNS Research, 94400 Vitry Sur Seine, France

*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (e-mail: buee@lille.inserm.fr)

Accepted 13 January 2005

Journal of Cell Science 118, 1291-1298 Published by The Company of Biologists 2005
doi:10.1242/jcs.01724

Summary

In large models of neuronal cell death, there is a tight correlation between Cdk5 deregulation and cell-cycle dysfunction. However, pathways that link Cdk5 to the cell cycle during neuronal death are still unclear. We have investigated the molecular events that precede p25/Cdk5-triggered neuronal death using a neuronal cell line that allows inducible p25 expression. In this system, no sign of apoptosis was seen before 24 hours of p25 induction. Thus, at that time, cell-cycle-regulatory proteins were analysed by immunoblotting and some of them showed a significant deregulation. Interestingly, after time-course experiments, the earliest feature correlated with p25 expression was the phosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb). Indeed, this phosphorylation was observed 6 hours after p25 induction and was abolished in the presence of a Cdk5

inhibitor, roscovitine, which does not inhibit the usual Rb cyclin-D kinases Cdk4 and Cdk6. Furthermore, analyses of levels and subcellular localization of Cdk-related cyclins did not reveal any change following Cdk5 activation, arguing for a direct effect of Cdk5 activity on Rb protein. This latter result was clearly demonstrated by *in vitro* kinase assays showing that the p25-Cdk5 complex in our cell system phosphorylates Rb directly without the need for any intermediary kinase activity. Hence, Rb might be an appropriate candidate that connects Cdk5 to cell-cycle deregulation during neuronal cell death.

Key words: Apoptosis, Cell cycle, E2F-responsive genes, SKNSH-SY5Y neuroblastoma cells.

Introduction

Cell mechanisms that lead to apoptosis share some pathways with cell proliferation. This feature is even more surprising in differentiated cells such as neurons, in which it was suggested that a reactivation of the cell cycle is a key step towards apoptosis (Copani et al., 2001). In fact, neurons of the adult brain are in G0 phase: they do not divide and are differentiated. Post-mitotic neuronal cells coming out of G0 phase into G1 are usually stopped at the G1/S checkpoint and then undergo into either redifferentiation or apoptosis (Nagy, 2000; Liu and Greene, 2001a). Therefore, the deregulation of cell-cycle proteins may be considered to be pathological. It should be realized that re-expression of G1/S-phase markers is best correlated to the appearance of apoptosis in neurons. It is characterized by the formation of the cyclinD1-Cdk4/6 complex, phosphorylation of Rb, dissociation of the Rb-E2F complex and activation of genes leading to apoptosis (Freeman et al., 1994; Herrup and Busser, 1995; Osuga et al., 2000; Liu and Greene, 2001a).

Among the neuronal death inducers, Cdk5 is of particular interest. Cdk5 is a pro-directed phosphorylation kinase that belongs to the cyclin-dependent-protein-kinase family. However, its usual activators do not share any cyclin consensus sequence and are referred to as p35 and p39. Interestingly, p35 is usually anchored to the membrane because it has a myristoylation site in its N-terminus. The p35-Cdk5 complex

is abundant in the adult brain and Cdk5 activity increases in neurons during development. p35 can be proteolysed by calpains following changes in calcium homeostasis into a cytosolic C-terminal fragment referred to as p25 that is more stable than p35 and binds more tightly to Cdk5, leading to a hyperactive, mislocalized p25-Cdk5 complex (for review, see Dahavan and Tsai, 2001). Such cleavage of p35 to p25 has been reported in disorders such as Alzheimer's disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis (for reviews, see Patzke and Tsai, 2002; Shelton and Johnson, 2004). Furthermore, exposure of primary cortical neurons to various insults like A β peptide, H₂O₂ or glutamate also leads to p25 formation and cell death (Patrick et al., 1999; Lee et al., 2000; Kusakawa et al., 2000). However, no mechanisms have been determined by which this kinase complex triggers its neurotoxicity. It is worth noting that, in neurodegenerative disorders and cellular models of neuronal death in which p25-Cdk5 is probably involved, aberrant cell-cycle deregulation has been reported (Vincent et al., 1996; Vincent et al., 1997; Vincent et al., 1998; Nagy et al., 1997; Busser et al., 1998; Copani et al., 1999; Giovanni et al., 1999; Husseman et al., 2000; Zhu et al., 2000; Ranganathan et al., 2001; Yang et al., 2003). In addition, a tight correlation has been established between Cdk5 deregulation and expression of cell cycle regulatory proteins (Nguyen et al., 2002; Nguyen et al., 2003). Nevertheless, pathways linking Cdk5 to cell cycle remain obscure.

In order to address this question, we used a recently reported stable neuronal cell line that expresses an inducible p25-Cdk5 activity (Hamdane et al., 2003a). This constitutes a suitable cell model to follow the sequence of events preceding neuronal death when there is formation of the p25-Cdk5 complex.

Materials and Methods

Cell culture

p25-inducible SH-SY5Y cells that constitutively express the Tau isoform with three microtubule-binding domains (2+3-10-) (Tau-SY5Y) were used as the basis for a tetracycline-regulated mammalian expression T-Rex system (Invitrogen). Cells were transfected with inducible expression vector alone (mock cells) or with p25-encoding cDNA (p25 cells). Individual stable clones were generated and those that exhibited the weakest basal expression of p25 were selected. For induction of p25 expression, cells were maintained in medium with tetracycline at $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Hamdane et al., 2003a).

Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM nonessential amino acids, 50 U ml^{-1} penicillin/streptomycin, 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Blastidicin and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Zeocin (Invitrogen, France) in a 5% CO_2 humidified incubator at 37°C. Cells were differentiated for 7 days in Dulbecco's modified Eagle's medium or Ham's F12 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 U ml^{-1} penicillin/streptomycin, 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$ progesterone, 1% insulin-transferrin-selenium (Invitrogen), 10 ng ml^{-1} NGF (2.5S subunit, Sigma). Medium was replenished every 2 days. Roscovitine was added for 6 hours as described previously (Hamdane et al., 2003a).

Antibodies

Anti-Cdk5 monoclonal antibody (J-3; Santa Cruz Biotechnology, Tebu-Bio, France), polyclonal antibody against the p35 C-terminus (C-19; Santa Cruz Biotechnology), antibody against neuron-specific γ -enolase (NSE) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against lamin-B (H-90; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against p27^{Kip1} (C-19; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against p21^{Cip1} (C-19; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against caspase-3 (Cell Signaling Technology, Ozyme, France), mouse monoclonal antibody against Cdc2-p34 (17; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against cyclin D that recognizes cyclin D1 and cross-reacts with cyclin D2 (Cell Signaling Technology), rabbit polyclonal antibody against cyclin D3 (C-16, Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against cyclin A (C-19, Santa Cruz Biotechnology), affinity-purified rabbit polyclonal antibody against cyclin B1 (H-20, Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal antibody against cyclin E (HE12; Cell Signaling Technology), rabbit polyclonal antibody against Cdk2 (M2; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against Cdk4 (C-22; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal antibody against Cdk6 (C-21; Santa Cruz Biotechnology), affinity-purified rabbit polyclonal IgG against phospho-Rb (Ser807/811) and IgG against phospho-Rb (Ser795) (Cell Signaling Technology), mouse monoclonal IgG1 against Rb (IF8; Santa Cruz Biotechnology), rabbit affinity-purified antibody against the C terminus of Rb (C-15, Santa Cruz Biotechnology).

Western blotting

Cells were harvested in ice-cold RIPA modified buffer [50 mM Tris, pH 7.4, 1% Nonidet P-40 (NP-40), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA] with protease inhibitors (Complete Mini, Roche Applied Science) and 125 nM phosphatase inhibitor okadaic acid (Sigma), sonicated and stirred for 1 hour at 4°C. Cell lysate was

recovered in supernatant after centrifugation at 12,000 g, 4°C for 20 minutes. Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce Perbio Science, France). Samples were mixed with an equal volume of 2× Laemmli sample buffer and dithiothreitol, and heated for 5 minutes at 100°C; then, 10–20 μg were loaded onto Nu-PAGE Novex gels (Invitrogen). After transfer, membranes were blocked in TBS pH 8, 0.05% Tween-20 with 5% skimmed milk and incubated with primary antibody. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody (Sigma) was used as secondary antibody and HRP activity was detected with the ECL detection kit (Amersham Biosciences, France). For immunoblot analyses of immunoprecipitated complexes and in vitro kinase assays, HRP-conjugated antibody TrueBlot™ (eBioscience) was used. Restore™ western-blot stripping buffer (Perbio Pierce) was used before reprobing membranes.

Cytoplasmic and nuclear fractionation

Cells were harvested in ice-cold buffer A (10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.15% NP-40) supplemented with protease inhibitors (Complete Mini) and incubated for 10 minutes on ice. After centrifugation at 1000 g for 10 minutes, the supernatant was collected as the cytoplasmic fraction. Nuclei in the pellets were washed three times and then lysed in ice-cold RIPA modified buffer with protease inhibitors (Complete Mini) in an equal volume to that of buffer A. Centrifugation at 12,000 g at 4°C for 20 minutes allowed the recovery of the supernatant as the nuclear fraction. The BCA protein assay kit determined protein concentration.

Immunoprecipitation

Cells (after a 6 hour tetracycline treatment) were harvested in ice-cold NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP-40) supplemented with protease inhibitors, and cell lysates were prepared as described above. Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit. Cell lysates (800 μg at 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were incubated with 1 μg immunoprecipitating antibody for 1 hour at 4°C and then incubated overnight at 4°C with 20 μl anti-rabbit-IgG beads (TrueBlot Ig IP Beads, eBioscience). Immunoprecipitated complexes were washed four times with lysis buffer (centrifugation at 1000 g at 4°C for 5 minutes), recovered in 40 μl 2× Laemmli buffer with 50 mM of fresh dithiothreitol and boiled for 5 minutes, and then equal volume of samples were loaded onto SDS-PAGE gel and analysed by immunoblotting.

In vitro kinase assays

For immunopurified complexes, immunoprecipitation was performed as described above. Immunoprecipitated complexes were washed twice in NP-40 lysis buffer and once in Hepes buffer (40 mM Hepes, pH 7.2, 8 mM MgCl_2) and then used to phosphorylate 2 μg Rb-C fusion protein (containing Rb residues 701–928 fused to maltose-binding protein; Cell Signaling Technology) in 30 μl kinase buffer [40 mM Hepes, pH 7, 8 mM MgCl_2 , 125 nM okadaic acid, protease inhibitors (EDTA-free Complete Mini, Roche Applied Science), 10 mM ATP]. After incubation for 1 hour at 37°C, the reactions were stopped by adding 2 Laemmli buffer (1 volume) and boiling for 5 minutes.

For radiolabelled in vitro phosphorylation, kinase assays were carried out as above by substituting cold ATP with 10 μCi (γ ³²P)-ATP. Samples were loaded (equal volumes) onto SDS-PAGE gel. The gel was then dried and results were visualized using a phosphorImager.

For crude cell lysates, cells were harvested in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, supplemented with protease inhibitors (EDTA-free Complete Mini) and lysates were prepared as described above. Lysates (200 μg) were then used to perform in vitro kinase assays under the same

experimental procedure as for immunopurified complexes. When kinase inhibitors (roscovitine at 10 μ M, PD98059 at 50 μ M, SB203580 at 10 μ M and SP600125 at 50 μ M; Calbiochem) were used, they were mixed with cell lysates before adding kinase buffer and Rb-C fusion protein.

Results

Deleterious effect of p25-Cdk5 kinase in differentiated SY5Y cells

p25-inducible cells were generated from SH-SY5Y cells, which constitutively overexpress Tau protein (Tau-SY5Y) (Delobel et al., 2002; Delobel et al., 2003). As previously shown, p25 protein was not found in mock Tau-SY5Y cells. Conversely, p25 non-induced cells displayed a low basal expression of transgene protein, whereas tetracycline treatment induced high p25 expression, and an active p25-Cdk5 complex is formed, as shown by coimmunoprecipitation and in-vitro-phosphorylation experiments (Hamdane et al., 2003a). In this Tau-SY5Y cell system, Tau overexpression might counteract

toxicity linked to the basal level of p25, because no stable viable cells were obtained from native SH-SY5Y cells. Similarly, it has been reported that neurofilament proteins might serve as a 'phosphorylation sink' for p25-Cdk5 complex, hence sequestering it away from other death-inducing substrates (Couillard-Després et al., 1998; Nguyen et al., 2001; Patzke and Tsai, 2002).

In the present cell model, NGF-differentiated cells showed morphological changes including neurite retraction and the appearance of rounded cells only after 48 hours of p25 expression (Hamdane et al., 2003a). p25-Cdk5 toxicity was also investigated at the molecular level in differentiated cells. Caspase-3 cleavage was analysed at different times of p25 expression (with tetracycline) compared with p25 non-induced cells (without tetracycline). Caspase-3 activation was observed after 48 hours of p25 induction, whereas no caspase activity was detected after 24 hours (Fig. 1). Thus, in order to investigate the molecular events that precede p25-induced neuron death, all experiments were first performed after 24 hours of p25 induction.

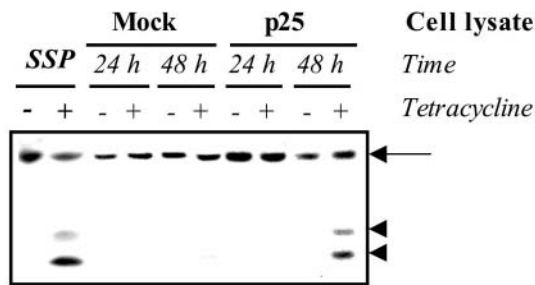


Fig. 1. Representative western-blot analysis of caspase-3 cleavage in a time-course experiment of p25 expression. NGF-differentiated (7 days) mock and p25 cells were treated (+) or not (-) with tetracycline for 24 hours or 48 hours, and lysates were analysed using anti-caspase-3 antibody that recognizes the full-length protein (35 kDa, arrow) and the large fragments resulting from its cleavage (19/17 kDa, arrowheads). As positive control, lysates derived from cells treated (+) or not (-) with 1 μ M staurosporine (SSP) were used.

Cell-cycle expression in p25-inducible Tau-SY5Y cells

Several reports show that the reactivation of the cell cycle is an early marker of neuron death. Thus, we investigated the expression of cell-cycle proteins in NGF-differentiated neuronal p25-inducible cells. First, the Cdk inhibitors p21 and p27 were analysed by western blotting in NGF-differentiated mock and p25 cells. After 24 hours of p25 induction, no change in p21 level was observed, whereas a significant decrease of p27 immunoreactivity was seen (Fig. 2A). Similarly, cyclin-A and -B1 levels were increased. Finally, the immunoreactivity of the kinase Cdc2-p34 was also increased. None of these changes was observed in mock cells treated with tetracycline compared with untreated ones. These results indicated that there is a deregulation of cell-cycle-regulatory proteins in p25-induced cells before death. These data are reminiscent of those observed in neuronal apoptosis and neurofibrillary degeneration.

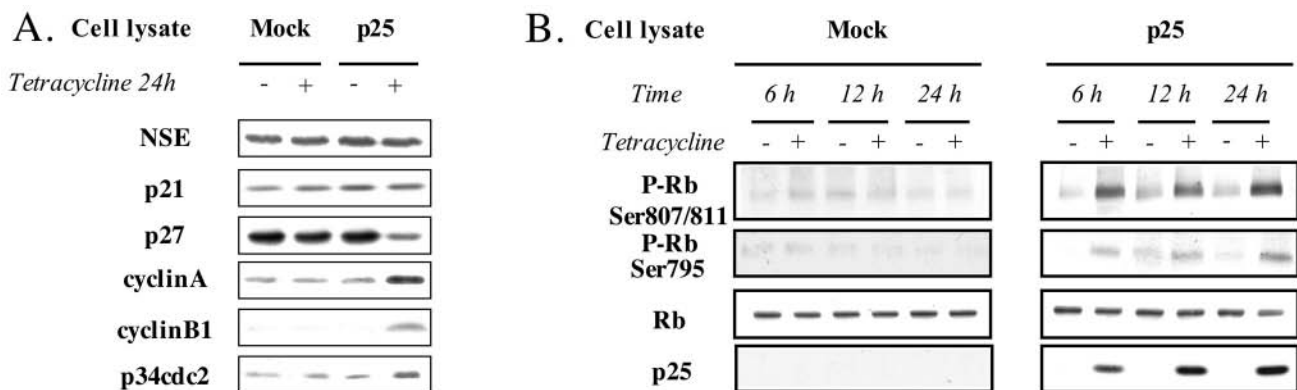


Fig. 2. (A) Representative immunoblot analyses of cell-cycle-regulatory proteins. NGF-differentiated mock and p25 cells were treated (+) or not (-) with tetracycline for 24 hours and lysates were analysed using antibodies against p21^{CIP1} (p21), p27^{KIP1} (p27), cyclin A, cyclin B1 and p34^{Cdc2}. Equal amounts of proteins were loaded, and visualized with an antibody against neuron-specific γ -enolase (NSE). (B) Analysis of Rb phosphorylation in a time-course experiment of p25 expression. Lysates from NGF-differentiated mock and p25 cells treated (+) or not (-) with tetracycline for 6 hours, 12 hours and 24 hours were first immunolabelled with antibodies against Ser807/811-phosphorylated and Ser795-phosphorylated Rb. After stripping, phosphorylation-independent antibody (IF-8) was used to visualize the amount of loaded Rb (Rb). Concomitant with this, p25 expression was analysed during the kinetics by antibody against the p35 C-terminus.

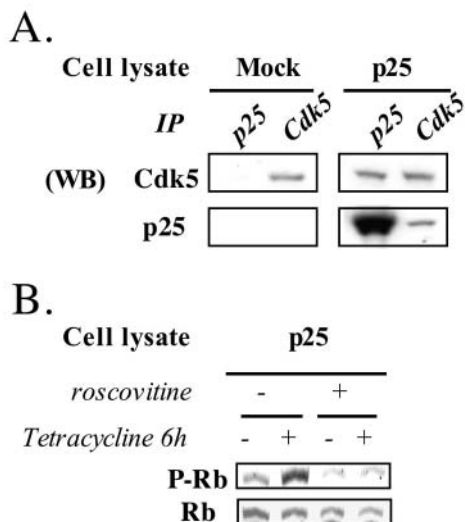


Fig. 3. (A) Analysis of p25-Cdk5 complex. Cell lysates from NGF-p25 and NGF-mock cells (used as negative control), treated for 6 hours with tetracycline, were subjected to immunoprecipitation (IP) by antibodies against either the p35 C-terminus or Cdk5. Immune complexes were then analysed by western blotting (WB) with antibodies against the p35 C-terminus and Cdk5. (B) Analysis of roscovitine's effect on earlier Rb phosphorylation. NGF-differentiated p25 cells were induced (+) or not (-) with tetracycline for 6 hours in the absence or the presence of 5 μ M roscovitine (-/+). Lysates were immunoblotted with antibody against phospho-Ser807/811 Rb (P-Rb) followed, after stripping, with the phosphorylation-independent antibody (IF-8) against Rb protein (Rb).

Cell-cycle reactivation was likely mediated through Rb phosphorylation

Among these cell-cycle genes, some are E2F-responsive genes encoding proteins including cyclin A and p34-Cdc2. In this respect, Rb might be of particular interest because its activity is involved in neuronal cell death and linked to E2F. In dividing cells, E2F forms an inhibited complex with hypophosphorylated form of Rb in G0/G1 phase. Inactivation of Rb by phosphorylation leads to its release from E2F, allowing transcription of E2F-responsive genes and G1/S-phase transition. In neuronal cells, Rb protein plays a crucial role in cell survival because its phosphorylation is tightly correlated to neuronal death (Galderisi et al., 2003; Greene et al., 2004).

In the present cell model of p25-Cdk5 neurotoxicity, Rb phosphorylation status was examined during a time-course experiment of p25 induction (6 hours, 12 hours and 24 hours of tetracycline treatment). Rb phosphorylation was visualized using phosphorylation-dependent antibodies (P-RbSer795 and P-RbSer807/811). Total Rb was then detected using an antibody recognizing Rb protein independently of its phosphorylation form (Rb). In controls, no change in Rb-phosphorylation status was observed between the two conditions: mock cells treated with tetracycline (+) compared with untreated ones (-). Conversely, a strong Rb phosphorylation was present after p25 induction. This phosphorylation was found as early as 6 hours after p25 induction (Fig. 2B). The different cell cycle markers studied

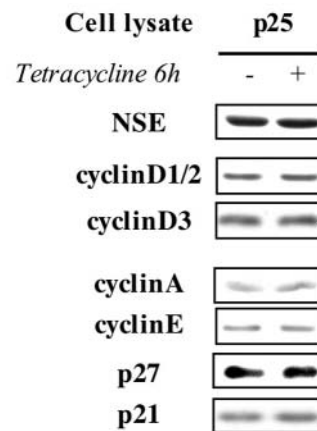


Fig. 4. Immunoblot analyses of cell-cycle-regulatory proteins at the earliest stage of p25 expression. NGF-differentiated p25 cells were treated (+) or not (-) with tetracycline for 6 hours and lysates were analysed using the indicated antibodies. Anti-NSE antibody was used after stripping the membranes to estimate the total amount of loaded proteins.

above (Fig. 2A) were then analysed following 6 hours of p25 induction. None of them displayed any change in immunoreactivity at this earlier time of p25 expression (data not shown).

As shown above, p25 expression was detected as early as 6 hours after tetracycline treatment. We then checked for formation of p25-Cdk5 complex at this earlier time. As showed by immunoprecipitation assay (Fig. 3A), Cdk5 is found associated with p25 protein in 6-hour tetracycline-treated cells. Furthermore, Rb phosphorylation was analysed in p25-induced cells in the presence of roscovitine, which specifically inhibits Cdk1, Cdk2 and Cdk5 but not cyclin-D-dependent kinases (Meijer et al., 1997; Meijer et al., 1999). In the present cell system, Rb phosphorylation was abolished by roscovitine (Fig. 3B), suggesting that it was specifically triggered by p25-Cdk5 kinase activity.

These data suggest that Rb phosphorylation in our model was an early event in p25-Cdk5 induced neuronal death. Nonetheless, it remains to be established whether p25-Cdk5 complex directly phosphorylates Rb or requires activation of intermediary kinases.

Rb phosphorylation and early cell-cycle-regulatory proteins

Rb phosphorylation is mainly regulated by cyclin-D-dependent kinases (Cdk4 and Cdk6). An increase in cyclin-D1 level is often considered to be necessary to leave G0 phase to G1 in neurons. Hence, the expression of cyclin D was investigated in the present cellular model from earlier time of p25 expression (Fig. 4). No variation in cyclin D1, D2 or D3 levels was observed following 6 hours of p25 expression (Fig. 4, compare + with -). Similarly, western-blot analyses did not show any increase in the immunoreactivity of cyclins E and A, the Cdk2 regulatory proteins, and the levels of related inhibitory proteins p21 and p27 did not decrease following p25-induced expression (Fig. 4). These data suggest that Rb phosphorylation is probably not associated with an increase in

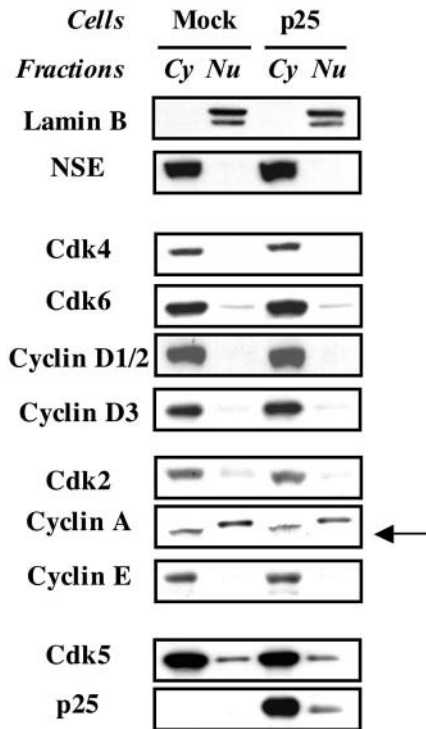


Fig. 5. Cell fractionation analysis. Cytoplasmic and nuclear fractions were prepared from NGF-mock and NGF-p25 cells, both treated for 6 hours with tetracycline. For each cell line, 10 μ g cytoplasmic fraction (Cy) and an equivalent volume of the nuclear fraction (Nu) were analysed by western blotting. Subcellular distribution of the specified proteins was visualized using specific antibodies. The arrowhead shows cyclin-A immunoreactivity (lower bands), as determined by comparison with the SDS-PAGE pattern of immunoprecipitated cyclin A (not shown). Stripped membranes were reprobbed with antibodies against NSE and lamin B to evaluate the purity of the cytoplasmic and nuclear fractions, respectively.

the levels of Cdk4 and Cdk6, and Cdk2-associated cyclins. However, because Cdk4, Cdk6 and Cdk2 activation could be linked to a change in cellular redistribution of related cyclins, western blotting was performed on fractionated cytoplasmic (Cy) and nuclear (Nu) extracts from mock and p25 cells, treated with tetracycline for 6 hours. As shown in Fig. 5, proper fractionation was checked by analysis of cellular distribution pattern of NSE and lamin B (cytoplasmic and nuclear markers, respectively).

Results showed that cyclins D1, D2 and D3, as well as their associated kinases Cdk4 and Cdk6, were mainly detected in the cytoplasm and their expression patterns were similar between p25-expressing cells and mock cells. Furthermore, p25 expression did not induce any cellular redistribution of cyclin A, cyclin E and their associated kinase Cdk2 (Fig. 5). Taken together, these data strongly suggest that Cdk4, Cdk6 and Cdk2 activities could not be involved in p25/Cdk5-induced Rb phosphorylation. Interestingly, analysis of cellular fractionation showed that p25 and Cdk5 could be detected in the nuclear fraction of p25-expressing cells (Fig. 5), arguing for a possible direct Rb phosphorylation by p25-Cdk5 complex.

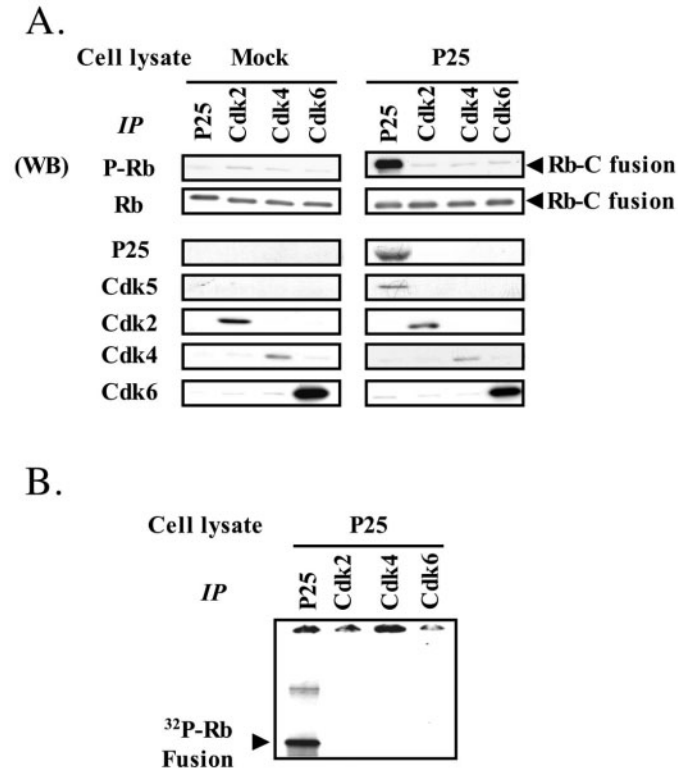
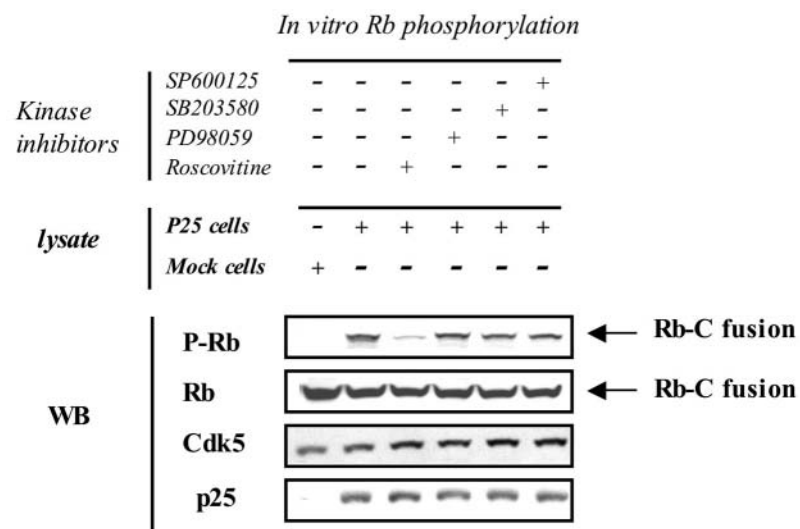


Fig. 6. Immunoprecipitation and in vitro kinase assays. Lysates from NGF-mock and NGF-p25 cells, both treated for 6 hours with tetracycline, were subjected to immunoprecipitation (IP) with the indicated antibodies. (A) Western-blot analyses. Following in vitro kinase assays, Rb-C fusion protein (68 kDa) phosphorylation was evaluated by immunoblotting using P-Rb Ser807/811 and P-Rb Ser795 antibodies that give similar results (representative immunoblot with P-Rb Ser807/811 is shown). To evaluate the amount of loaded Rb-C fusion protein, blots were stripped and reprobbed with a phosphorylation-independent antibody (C-15) directed against the C terminus of Rb (Rb). The lower sections of blots were also probed with specific antibodies to check the presence of the following proteins: p25, Cdk5, Cdk2, Cdk4 and Cdk6. (B) In vitro kinase assays in the presence of (γ - 32 P)ATP. Arrowhead indicates Rb-C fusion protein with incorporated 32 P, which is only seen in in vitro kinase assay with purified p25-Cdk5 complex.

Rb phosphorylation and the p25-Cdk5 kinase complex

p25 expression did not trigger any change in either the levels of Cdk4-, Cdk6- and Cdk2-related cyclins or their cellular localization following 6 hours of tetracycline treatment. Because, at this time, the only active Cdk was the complex p25-Cdk5, we asked whether Cdk5 could directly phosphorylate Rb. To address this question, in vitro kinase assays using Rb-C fusion protein as substrate were performed by p25-Cdk5 complex from p25-expressing cells.

Monitoring of P-Ser807/811 and P-Ser795 (P-Rb) immunoreactivities showed that an immunoprecipitated p25-Cdk5 complex from p25-expressing cells phosphorylates Rb (Fig. 6A). Conversely, western-blot analyses of in vitro Rb phosphorylation by immunoprecipitated Cdk2, Cdk4 and Cdk6 revealed no significant activity from either mock cells or p25 ones (Fig. 6A). These experiments were confirmed by in vitro kinase assays in the presence of (γ - 32 P)-ATP (Fig. 6B). These



data clearly demonstrate that, in the present cell model, Cdk2, Cdk4 and Cdk6 were not involved in Rb phosphorylation. It is worth noting that analyses of immunoprecipitated complexes showed that p25 protein was associated with Cdk5 and not any other Cdks (Fig. 6A), confirming that Rb phosphorylation is exclusively linked to the p25-Cdk5 complex. To confirm this and to exclude the involvement of other non-studied kinases, *in vitro* kinase assays were performed using crude lysate from 6-hour p25-expressing cells in the presence of kinase inhibitors including roscovitine, PD98059 (MEK1 inhibitor), SB203580 (p38 inhibitor) and SP600125 (JNK inhibitor). Rb phosphorylation was monitored by western blotting using anti-phospho-Rb antibodies. As shown in Fig. 7, lysate from p25-expressing cells (unlike that from mock cells) could phosphorylate Rb protein. Interestingly, this phosphorylation was abolished in the presence of the Cdk inhibitor roscovitine, whereas no effect was shown with the other inhibitors. Hence, all these data clearly demonstrate that the p25-Cdk5 complex in the present cell model is involved in a direct phosphorylation of Rb independent of cyclin-D-associated kinases.

Discussion

A broad range of neuronal cell death models have showed coexistence between deregulation of Cdk5 activity and expression of cell-cycle-regulatory proteins (Nguyen et al., 2002), and a close link between these two events was established by a recent study (Nguyen et al., 2003). Furthermore, the p25-Cdk5 complex was shown to be harmful to neurons, as evidenced by cytoskeleton disruption, neuritic retraction and expression of apoptotic markers (Ahlijanian et al., 2000; Bian et al., 2002; Patrick et al., 1999; Hamdane et al., 2003a). Interestingly, deregulation of Cdk5 activity by association with its activator p25 is likely to be involved in AD pathogenesis (Lee et al., 1999; Patrick et al., 1999; Patrick et al., 2001; Cruz et al., 2003; Noble et al., 2003). Concurrently, evidence indicates an involvement of cell-cycle-regulatory elements in neurodegeneration. Indeed, both G1/S- and G2/M-phase markers are found in neurons undergoing neurofibrillary degeneration during AD (Vincent et al., 1996; Nagy et al., 1997; Vincent et al., 1997; Vincent et al., 1998; Busser et al.,

Fig. 7. Western blotting of *in vitro* kinase assays with crude cell extracts. Lysates from NGF/p25-expressing cells (6 hours of tetracycline treatment) were used for Rb-C fusion protein phosphorylation, alone and in the presence of the kinase inhibitors roscovitine, PD98059, SB203580 and SP600125. As negative control, an *in vitro* kinase assay was performed with lysate from NGF-mock cells treated for 6 hours with tetracycline. Phosphorylation of Rb-C fusion protein (P-Rb) was monitored by P-Rb Ser807/811 and Ser795 antibodies, which showed similar data. After stripping, membranes were probed with a phosphorylation-independent antibody against Rb (C-15) to evaluate the amount of loaded Rb-C fusion protein (Rb). The lower side of membrane was analysed by immunoblotting for the levels of p25 and Cdk5, which attests to the presence of equivalent amounts of crude lysate in each kinase reaction.

1998; Husseman et al., 2000; Zhu et al., 2000; Dranovsky et al., 2001; Ranganathan et al., 2001; Hamdane et al., 2003b; Yang et al., 2003).

We recently showed that the p25-Cdk5 complex induced the appearance of mitotic epitopes in differentiated neuronal cells (Hamdane et al., 2003a), which are considered to be early markers of neurofibrillary degeneration in AD (Vincent et al., 1998; Augustinack et al., 2002). In this cell system and prior to neuronal death, p25-Cdk5 kinase induced expression of regulatory proteins of both G1/S and G2/M phases. The present data provide an additional support of a tight correlation between Cdk5 deregulation and expression of cell-cycle markers during neuronal cell death. Time-course experiments of p25 expression showed that Rb phosphorylation was an early event in p25/Cdk5-induced neurotoxicity. This result is of particular interest because the pathways that mediate the deleterious effects of p25-Cdk5 kinase in neurons remain unclear. In neuronal cells, Rb phosphorylation leads to cell death, probably by subsequent transactivation of E2F-responsive genes involved in regulation of neuron survival (Park et al., 2000; Liu and Greene, 2001b; Galderisi et al., 2003; Greene et al., 2004). Aberrant expression of other E2F-targeted genes, like some that encode cell-cycle-regulatory proteins, might also occur. Our results showed an increase in the levels of E2F-responsive genes, including those encoding cyclin A and Cdc2-p34, following Rb phosphorylation. This might explain why both G1/S- and G2/M-phase markers of the cell cycle are found in degenerating neurons during AD (Vincent et al., 1997; Husseman et al., 2000).

Some data from the literature suggested that Rb phosphorylation could be mediated through Cdk5 pathway. First, Ser residues at positions 807/811 of Rb protein are located in a consensus sequence with basic residue at position +3 preferentially targeted by Cdk5 (Songyang et al., 1996; Sharma et al., 1999). In addition, it has been reported that p25-Cdk5 complex is able to interact with Rb protein *in vitro* and to phosphorylate it (Lee et al., 1997). Because Rb has been shown to associate with partners such as cyclin D through the common peptide sequence motif LXCXE, Cdk5 binding might be mediated by a related sequence motif (LXCXXE) found in p25 (Lee et al., 1997). Furthermore, p25-Cdk5 is detected in

the nucleus of degenerating neurons (Patrick et al., 1999) and interacts with nuclear substrates (Zhang et al., 2002; Gong et al., 2003). In agreement with that, our experiments showed a nuclear localization of p25 and Cdk5. Moreover, p25-Cdk5 complex isolated from the present cell system leads to Rb phosphorylation in vitro.

It is worth noting that an increase in cyclin-D1 level, which is necessary to exit from G0 phase to G1 in neurons, is often characterized as an early event leading to Rb phosphorylation and then neuronal apoptosis. Our data revealed that this pathway could be a shortcut through the p25-Cdk5 complex that allows direct Rb phosphorylation. Indeed, in our time-course experiments, Rb phosphorylation was correlated with p25 expression. At that time, no variation in the levels or the subcellular localization of cyclins D1, D2 and D3 was observed. Besides, Rb phosphorylation was abolished in the presence of roscovitine. This latter is a Cdc2, Cdk2 and Cdk5 inhibitor but not an inhibitor of cyclin-D-dependent kinases (Cdk4/Cdk6). More importantly, analysis of Cdk4, Cdk6 and Cdk2 activities by in vitro kinase assays did not reveal any change following p25 expression. Finally, in vitro kinase assays using p25 cell lysate in the presence of kinase inhibitors clearly demonstrate that Rb protein was directly phosphorylated by p25-Cdk5 in the current cell system.

Mechanisms by which Cdk5 triggers its deleterious effects during neurodegeneration are not well elucidated. On one hand, these effects were related to Tau phosphorylation, leading to microtubule destabilization (Ahlijanian et al., 2000; Nguyen et al., 2001; Bu et al., 2002). On the other hand, several reports, including ours, show a link between Cdk5 and cell-cycle proteins during neuron death. Activation of cell-cycle signalling might constitute a crucial step in the neuronal death pathway inherent to p25-Cdk5 kinase complex. These pieces of evidence led us to hypothesize that deregulation of Cdk5 triggers the aberrant phosphorylation of different substrates, involving pathways that will concomitantly promote neurodegeneration. It will be interesting to perform more investigations on available models of neuronal death to identify relevant players for neurodegeneration, allowing an improved understanding of this process.

In conclusion, our data argue for the involvement of p25-Cdk5 in the deregulation of cell-cycle-regulatory proteins that occurs during neuronal death and identify Rb as having a function in the survival of neuron as an early target of this kinase complex.

We thank K. MacLeod (Chicago, IL, USA), M.-H. David-Cordonnier, J.-C. D'Halluin and N. Sergeant (Lille, France) for helpful discussions. These studies were supported by Aventis Pharma, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), grants from the Institute for the Study of Aging (New York, USA), the Région Nord-Pas-de-Calais (Géopole de Lille) and the Fonds Européen de Développement Régional. AVS was a recipient of a fellowship from the Regions Guadeloupe and Nord/Pas-de-Calais. AB is a recipient of a scholarship co-sponsored by Région Nord/Pas-de-Calais and CHRU-Lille.

References

Ahlijanian, M. K., Barrezueta, N. X., Williams, R. D., Jakowski, A., Kowsz, K. P., McCarthy, S., Coskran, T., Carlo, A., Seymour, P. A.,

- Burkhardt, J. E. et al. (2000). Hyperphosphorylated Tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2910-2915.
- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M. and Hyman, B. T. (2002). Specific Tau phosphorylation sites correlates with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **103**, 26-35.
- Bian, F., Sobocinski, G., Roohar, R. N., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Pack, A., Wang, K. K. and Walker, L. C. (2002). Axonopathy, Tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J. Comp. Neurol.* **446**, 257-266.
- Bu, B., Li, J., Davies, P. and Vincent, I. (2002). Deregulation of Cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type-C murine model. *J. Neurosci.* **22**, 6515-6525.
- Busser, J., Geldmacher, D. S. and Herrup, K. (1998). Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *J. Neurosci.* **18**, 2801-2807.
- Copani, A., Condorelli, F., Caruso, A., Vancheri, C., Sala, A., Giuffrida Stella, A. M., Canonic, P. L., Nicoletti, F. and Sortino, M. A. (1999). Mitotic signaling by beta-amyloid causes neuronal death. *FASEB J.* **13**, 2225-2234.
- Copani, A., Uberti, D., Sortino, M. A., Bruno, V., Nicoletti, F. and Memo, M. (2001). Activation of cell cycle associated proteins in neuronal death: a mandatory or dispensable path? *Trends Neurosci.* **24**, 25-31.
- Couillard-Després, J. S., Zhu, Q., Wong, P. C., Price, D. L., Cleveland, D. W. and Julien, J. P. (1998). Protective effect of neurofilament heavy gene overexpression in motor neuron disease induced by mutant superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9626-9630.
- Cruz, J. C., Tseng, A.-C., Goldman, J. A., Shih, H. and Tsai, L.-H. (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* **40**, 471-483.
- Dahavan, R. and Tsai, L. H. (2001). A decade of CDK5. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 749-759.
- Delobel, P., Flament, S., Hamdane, M., Mailliot, C., Sambo, A. V., Bégard, S., Sergeant, N., Delacourte, A., Vilain, J. P. and Buée, L. (2002). Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *J. Neurochem.* **83**, 412-420.
- Delobel, P., Mailliot, C., Hamdane, M., Sambo, A. V., Bégard, S., Violleau, A., Delacourte, A. and Buée, L. (2003). Stable-Tau overexpression in human neuroblastoma cells: an open door for explaining neuronal death in tauopathies. *Ann. New York Acad. Sci.* **1010**, 623-634.
- Dranovsky, A., Vincent, I., Gregori, L., Schwarzman, A., Colflesh, D., Enghild, J., Strittmatter, W., Davis, P. and Goldgaber, D. (2001). Phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol. Aging* **22**, 517-528.
- Freeman, R. S., Estus, S. and Johnson, E. M. (1994). Analysis of cell cycle-related gene expression in post-mitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* **12**, 343-355.
- Galderisi, U., Jori, F. P. and Giordano, A. (2003). Cell cycle regulation and neuronal differentiation. *Oncogene* **22**, 5208-5219.
- Giovanni, A., Wirtz-Brugger, F., Keramaris, E., Slack, R. and Park, D. S. (1999). Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent-kinases, pRb, and E2F x DP in B-amyloid-induced neuronal death. *J. Biol. Chem.* **274**, 19011-19016.
- Gong, X., Tang, X., Wiedmann, M., Wang, X., Peng, J., Zheng, D., Blair, L. A. C., Marshall, J. and Mao, Z. (2003). Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis. *Neuron* **38**, 33-46.
- Greene, L. A., Biswas, S. C. and Liu, D. X. (2004). Cell cycle molecules and vertebrate neuron death: E2F at the hub. *Cell Death Differ.* **11**, 49-60.
- Hamdane, M., Sambo, A. V., Delobel, P., Bégard, S., Violleau, A., Delacourte, A., Bertrand, P., Benavides, J. and Buée, L. (2003a). Mitotic-like Tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 34026-34034.
- Hamdane, M., Delobel, P., Sambo, A. V., Smet, C., Bégard, S., Violleau, A., Landrieu, I., Delacourte, A., Lippens, G., Flament, S. et al. (2003b). Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1619-1625.
- Herrup, K. and Busser, J. C. (1995). The induction of multiple cell cycle events precede target-related neuronal death. *Development* **121**, 2385-2395.
- Hussemann, J. W., Nochlin, D. and Vincent, I. (2000). Mitotic activation: a convergent mechanism for a cohort of neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* **21**, 815-828.
- Kusakawa, G., Saito, T., Onuki, R., Ishiguro, K., Kishimoto, T. and

- Hisanaga, S.** (2000). Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* **275**, 17166-17172.
- Lee, K. Y., Helbing, C. C., Choi, K. S., Johnston, R. N., and Wang, J. H.** (1997). Neuronal Cdc2-like kinase (Nclk) binds and phosphorylates the retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 5622-5626.
- Lee, K. Y., Clark, A. W., Rosales, J. L., Chapman, K., Fung, T. and Johnston, R. N.** (1999). Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci. Res.* **402**, 21-29.
- Lee, M. S., Known, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M. and Tsai, L. H.** (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* **405**, 360-364.
- Liu, D. X. and Greene, L. A.** (2001a). Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res.* **305**, 217-228.
- Liu, D. X. and Greene, L. A.** (2001b). Regulation of neuronal survival and death by E2F-dependent gene repression and derepression. *Neuron* **32**, 425-438.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J. G. and Moulinox, J. P.** (1997). Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases Cdc2, Cdk2 and Cdk5. *Eur. J. Biochem.* **243**, 527-536.
- Meijer, L., Leclerc, S. and Leost, M.** (1999). Properties and potential applications of chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Pharmacol. Ther.* **82**, 279-284.
- Nagy, Z.** (2000). Cell cycle regulatory failure in neurons: causes and consequences. *Neurobiol. Aging* **21**, 761-769.
- Nagy, Z., Esiri, M. M., Cato, A. M. and Smith, A. D.** (1997). Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **94**, 6-15.
- Nguyen, M. D., Lariviere, R. C. and Julien, J. P.** (2001). Deregulation of Cdk5 in a mouse model of ALS: toxicity alleviated by perikaryal neurofilament inclusions. *Neuron* **30**, 135-147.
- Nguyen, M. D., Mushynski, W. E. and Julien, J. P.** (2002). Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death Differ.* **9**, 1294-1306.
- Nguyen, M. D., Boudreau, M., Kriz, J., Couillard-Després, S., Kaplan, D. R. and Julien, J. P.** (2003). Cell cycle regulators in the neuronal death pathway of ALS caused by mutant superoxide dismutase 1. *J. Neurosci.* **23**, 2131-2140.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T. et al.** (2003). Cdk5 is a key factor in Tau aggregation and tangles formation in vivo. *Neuron* **38**, 555-565.
- Osuga, H., Osuga, S., Wang, F., Fetni, R., Hogan, M. J., Slack, R. S., Hakim, A. M., Ikeda, J. E. and Park, D. S.** (2000). Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for Stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10254-10259.
- Park, D. S., Morris, E. J., Bremner, R., Keramaris, E., Padmanabhan, J., Rosenbaum, M., Shelanski, M., Geller, H. M. and Greene, L. A.** (2000). Involvement of Rb family members and E2F/DP complexes in the death of neurons evoked by DNA damage. *J. Neurosci.* **20**, 3104-3114.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H.** (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* **402**, 615-622.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H.** (2001). Neurobiology of p25 protein in neurodegeneration. *Nature* **411**, 764-765.
- Patzke, H. and Tsai, L.-H.** (2002). CDK5 sinks into ALS. *Trends Neurosci.* **25**, 8-10.
- Ranganathan, S., Scudiere, S. and Bowser, R.** (2001). Hyperphosphorylation of the retinoblastoma gene product and altered subcellular distribution of E2F-1 during Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Alzheimer's Dis.* **3**, 377-385.
- Sharma, P., Steinbach, P. J., Sharma, M., Amin, N. D., Barchi, J. J. and Pant, H. C.** (1999). Identification of substrate binding site of cyclin-dependent kinase 5. *J. Biol. Chem.* **274**, 9600-9606.
- Shelton, S. B. and Johnson, G. V. W.** (2004). Cyclin-dependent kinase-5 in neurodegeneration. *J. Neurochem.* **8**, 1313-1326.
- Songyang, Z., Lu, K. P., Kwon, Y. T., Tsai, L. H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D. A., Soderling, T. R., Bartleson, C., Graves, D. J. et al.** (1996). A structural basis of substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequences preference of casein kinase I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and ERK 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6486-6493.
- Vincent, I., Rosado, M. and Davis, P.** (1996). Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J. Cell Biol.* **132**, 413-425.
- Vincent, I., Jicha, G., Rosado, M. and Dickson, D. W.** (1997). Aberrant expression of mitotic Cdc2:cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **17**, 3588-3598.
- Vincent, I., Zheng, J. H., Dickson, D. W., Kress, Y. and Davis, P.** (1998). Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **19**, 287-296.
- Yang, Y., Mufson, E. J. and Herrup, K.** (2003). Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **23**, 2557-2563.
- Zhang, J., Krishnamurthy, P. K. and Johnson, G.** (2002). Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity. *J. Neurochem.* **81**, 307-313.
- Zhu, X., Raina, A. K., Boux, H., Simmons, Z. L., Takeda, A. and Smith, M. A.** (2000). Activation of oncogenic pathways in degenerating neurons in Alzheimer's disease. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 433-437.

2.2.3 Conclusions

Après avoir montré, dans des cellules de type neuronal, que le complexe kinasique p25/Cdk5 était responsable d'une phosphorylation mitotique de Tau de type TG-3 (Hamdane *et al.*, 2003b), nous nous sommes posés la question de savoir si cette activité kinasique pouvait être également impliquée dans l'apparition d'autres marqueurs du cycle cellulaire observés au cours de la DNF. Nos résultats montrent que ce complexe kinasique est capable, dans des cellules différenciées, d'induire une signalisation spécifique menant, après 24 heures de surexpression, à l'apparition de marqueurs du cycle cellulaire tels que la cycline A, la cycline B1 et p34cdc2 et à la diminution de l'inhibiteur de Cdk : p27/kip1 (Figure 2A de l'article). Suite à certaines conditions de stress cellulaires et par des mécanismes peu connus, la réentrée de cellules différenciées en phase quiescente (G0) dans le cycle cellulaire est rendue possible grâce à la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome. En effet, cet événement moléculaire est indispensable à la levée de l'inhibition de la réponse E2F et à la réentrée des cellules dans le cycle. Dans notre modèle, nous montrons que la phosphorylation de Rb apparaît de façon précoce après 6 heures de surexpression de p25 (Figure 2B de l'article). De plus, des traitements pharmacologiques par un inhibiteur de l'activité p25/Cdk5 (roscovitine) *in cellulo* ainsi que des expériences de phosphorylation de la protéine Rb *in vitro* par le complexe p25/Cdk5 immunoprécipité, nous ont permis de montrer que ce dernier était directement responsable de la phosphorylation de Rb aux sites régulateurs : Ser795 et Ser807/811 (Figure 3A et 6 de l'article). Enfin, nous avons pu également montrer que les acteurs classiquement décrits pour réguler la phosphorylation de Rb dans des cellules en prolifération, tels que les complexes cycline D1-cdk4/6 et cycline E-cdk2 et leurs inhibiteurs p21 et p27, n'étaient pas modulés après 6 heures de surexpression (Figure 4 de l'article). Ces résultats suggèrent ainsi que 1) les éléments régulateurs de Rb ne sont pas impliqués dans la phosphorylation de Rb observée dans nos cellules différenciées et 2) que le complexe p25/Cdk5 pourrait constituer une « voie d'évitement » aux points de contrôles du cycle et permettre ainsi une réentrée des cellules différenciées dans le cycle ([Figure 19, p.76](#)).

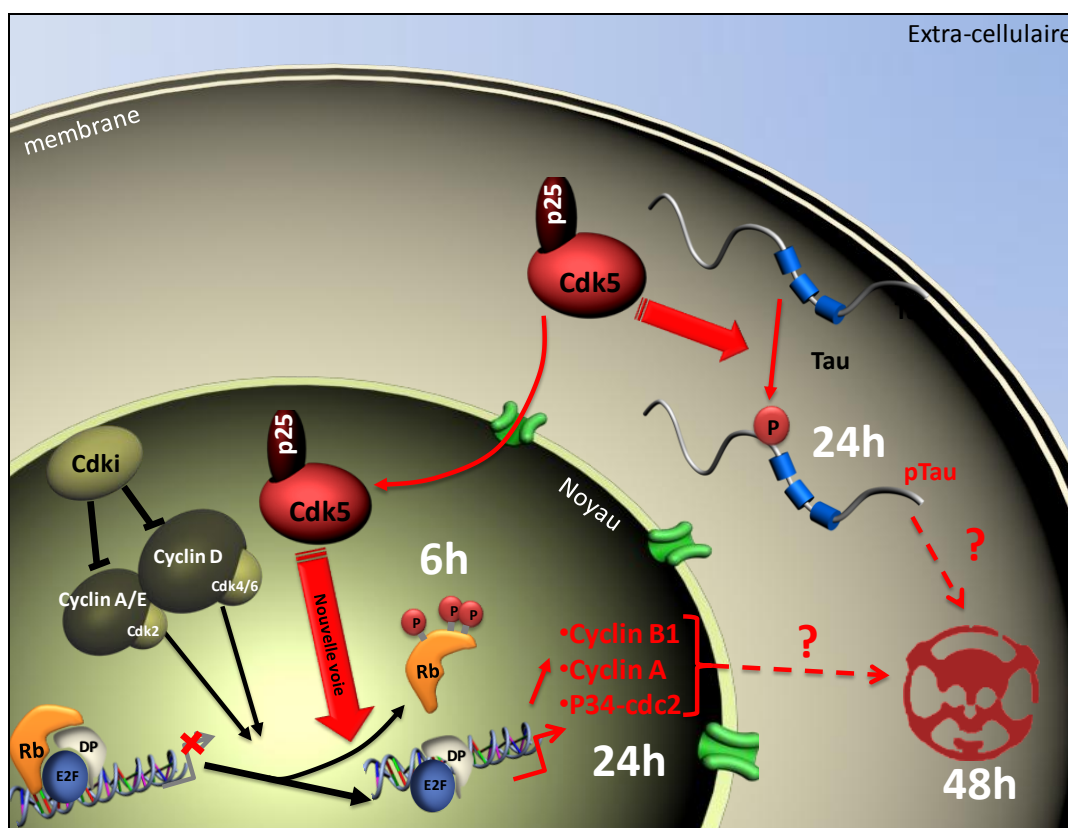


Figure 19 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la mort neuronale suite à la surexpression de p25 :

Le complexe p25/Cdk5, de par sa délocalisation cytoplasmique et nucléaire, sera capable de phosphoryler des substrats non physiologiques tels que la protéine Tau (cytoplasme) et la protéine du rétinoblastome (noyau). La présence d'une dérégulation de marqueurs du cycle cellulaire, causée par la phosphorylation précoce de la protéine Rb, et d'une phosphorylation anormale de Tau à la Thr231 à 24h entraînent, par un mécanisme encore inconnu, la mort de cellules de type neuronal à 48h.

En résumé, ce travail, montre que le complexe kinasique p25/Cdk5 pourrait être impliqué de façon importante dans la dégénérescence neuronale observée dans la MA. En effet, la surexpression de p25 l'activateur pathologique de Cdk5 est à elle seule responsable de l'apparition de trois stigmates observés dans cette dégénérescence liée à Tau, à savoir : 1) une phosphorylation anormale de Tau de type mitotique et 2) une réapparition de marqueurs du cycle cellulaire qui sont suivis par 3) une mort des cellules de type neuronal. Cependant, actuellement, nous ignorons encore la contribution de chacun de ces deux événements moléculaires (phosphorylation anormale de Tau et dérégulation des marqueurs du cycle) dans cette mort des cellules de types neuronal.

Enfin, des études de solubilités de Tau menées précédemment (Hamdane et al., 2003b) ainsi que nos études récentes visant à étudier l'agrégation de Tau par microscopie électronique dans ce modèle n'ont montré ni l'existence de filaments de Tau ni de diminution de sa solubilité. Ces données suggèrent ainsi que la phosphorylation anormale de Tau à

l'épitope TG-3 n'est pas, à elle seule, suffisante pour entraîner ces modifications et que d'autres mécanismes additionnels sont nécessaires pour l'apparition d'agrégats de Tau.

2.3 Bilan modèles cellulaires

Les résultats, obtenus à partir de ces deux modèles suggèrent que les mutations de Tau ou sa phosphorylation anormale observée dans le modèle p25 ne sont pas, à elles seules, suffisantes pour entraîner une fibrillogénèse de Tau. En effet, si nous avons montré, en premier lieu, que les mutations de Tau étaient capables d'induire des modifications de son état de phosphorylation associées à des changements de conformation et probablement à une initiation de l'agrégation de Tau, aucun filament de Tau n'a été observé dans notre système cellulaire. *Secondo*, l'activation pathologique de la kinase neuronale Cdk5 induit une mort cellulaire associée à l'apparition de certains événements moléculaires observés dans la pathologie (phosphorylation anormale de Tau et dérégulation de marqueurs du cycle cellulaire) sans présenter, pour cela, d'agrégats de Tau.

Ces résultats étaient inattendus puisque les mutations DFTP-17 ([Tableau 4, p.53](#)), ou la dérégulation de l'activité Cdk5 par p25 (Cruz *et al.*, 2003) semblent suffisantes pour entraîner une DNF dans les modèles murins. Cependant, dans ces modèles, la DNF et les PHFs apparaissent chez des souris au minimum âgées 3 mois. Ceci laisserait supposer, de prime abord, qu'un facteur temps, absent dans les modèles cellulaires, pourrait être à l'origine de l'absence de la formation d'agrégats. Cependant, les résultats obtenus dans deux modèles cellulaires récents, basés sur la surexpression de constructions amino-tronquées de Tau (Khlistunova *et al.*, 2006) ou de constructions de Tau comportant des modifications de ses domaines répétés (Iliev *et al.*, 2006), montrent une agrégation de ces protéines après 24 heures de surexpression. De plus, des données de la littérature montrent que l' α -synucléine, une protéine partageant des caractéristiques biophysiques communes avec Tau et étant le constituant majeur des corps de Lewy de la maladie de parkinson, est capable de s'agréger rapidement dans les modèles cellulaires (Junn *et al.*, 2002; Junn *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002). Ces données suggèrent donc, en partie, que le facteur temps n'est pas responsable de l'absence d'une agrégation de la protéine Tau complète.

Finalement, l'absence d'agrégats structurés dans nos modèles cellulaires mène aux hypothèses que des événements moléculaires additionnels sont probablement nécessaires à

l'apparition de telles structures ou que des systèmes de compensation tels que les systèmes de dégradation protéique (protéasome et voies de dégradation lysosomiales) prennent en charge ces protéines anormalement modifiées afin d'éviter l'apparition de ces structures. Ces systèmes de veille pourraient présenter une diminution d'efficacité au cours du vieillissement chez l'homme et dans les modèles murins et concourir, ainsi, à l'apparition des PHFs.

Dans ce cadre, nos modèles représentent des outils adéquats pour tester ces hypothèses quant à l'implication d'événements moléculaires additionnels ou de la dysfonction de ces systèmes de compensation. Les résultats pertinents obtenus à partir des études exploratoires réalisées dans ces modèles cellulaires pourront alors être validés dans notre modèle animal.

Parmi les candidats potentiels qui pourraient intervenir dans la prise en charge de ces protéines Tau anormalement modifiées, notre laboratoire s'intéresse à une protéine particulière nommée Pin1 qui permettrait à la fois d'agir sur l'état de phosphorylation de Tau et sur sa conformation.

2.4 Pin1 : une isomérase permettant la déphosphorylation différentielle de Tau

2.4.1 Objectifs

La protéine Pin1 est une isomérase impliquée dans la catalyse de l'isomérisation *cis/trans* des liaisons peptidiques S/P-T/P. Cette protéine a initialement été montrée comme une protéine nucléaire interagissant et régulant des phosphoprotéines mitotiques lui conférant ainsi un rôle de protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (Lu *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1998; Yaffe *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2000). À côté, de nombreuses évidences ont montré que Pin1 pouvait être potentiellement impliquée dans la MA (Hamdane *et al.*, 2003b; Hamdane *et al.*, 2002; Ramakrishnan *et al.*, 2003; Sultana *et al.*, 2006) et les Tauopathies (Thorpe *et al.*, 2004) (et pour revue (Butterfield *et al.*, 2006)). De plus, un modèle de souris invalidées pour la protéine Pin1 (KO Pin1) présente des lésions de type DNF (Liou *et al.*, 2003). Ces données suggèrent ainsi une relation entre Pin1 et Tau qui a été confirmée par des études *in vitro* montrant que Pin1 pouvait lier Tau sur au moins un des sites de phosphorylation dérégulé dans la MA : l'épitope TG-3 à la pT231 (Hamdane *et al.*, 2002; Smet *et al.*, 2005; Wintjens *et al.*, 2001). Cette interaction de Pin1 avec Tau permettrait

ensuite l'action de la Trans-phosphatase PP2a et faciliterait, de ce fait, la déphosphorylation de Tau (Zhou *et al.*, 2000).

Cependant, à ce jour, le rôle physiologique précis de Pin1 et sa biologie dans les neurones restent encore mal connus. L'objectif de cette étude a donc été de caractériser l'expression de Pin1 dans des cellules neuronales et d'étudier l'effet de Pin1 sur l'état de phosphorylation des protéines Tau *in cellulo*.

2.4.2 Résultats

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

Malika Hamdane, Pierre Dourlen, Alexis Bretteville, Anne-Véronique Sambo, Stéphanie Ferreira, Kunie Ando, Olivier Kerdraon, Séverine Bégard, Linda Geay, Guy Lippens, Nicolas Sergeant, André Delacourte, Claude-Alain Maurage, Marie-Christine Galas and Luc Buée (2006). **Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells.** *Mol Cell Neurosci* 32, 155-60.

Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells

Malika Hamdane,^{a,b} Pierre Dourlen,^{a,b} Alexis Bretteville,^{a,b} Anne-Véronique Sambo,^{a,b} Stéphanie Ferreira,^{a,b} Kunie Ando,^{a,b} Olivier Kerdraon,^{a,b} Séverine Bégard,^{a,b} Linda Geay,^{a,b} Guy Lippens,^c Nicolas Sergeant,^{a,b} André Delacourte,^{a,b} Claude-Alain Muraige,^{a,b} Marie-Christine Galas,^{a,b} and Luc Buée^{a,b,*}

^aInserm, U815, Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, F-59045 Lille, France

^bUniversité Lille2, Faculté de Médecine, Lille, France

^cCNRS, UMR 8576, Université Lille1, Villeneuve d'Ascq, France

Received 2 August 2005; revised 17 January 2006; accepted 30 March 2006
Available online 11 May 2006

Neurofibrillary degeneration is likely to be related to abnormal Tau phosphorylation and aggregation. Among abnormal Tau phosphorylation sites, pThr231 is of particular interest since it is associated with early stages of Alzheimer's disease and is a binding site of Pin1, a peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase mainly involved in cell cycle regulation. In the present work, Pin1 level was found strongly increased during neuronal differentiation and tightly correlated with Tau dephosphorylation at Thr231. Likewise, we showed in cellular model that Pin1 allowed for specific Tau dephosphorylation at Thr231, whereas other phosphorylation sites were unchanged. Moreover, cells displaying Tau phosphorylation at Thr231 did not show any Pin1 nuclear depletion. Altogether, these data indicate that Pin1 has key function(s) in neuron and is at least involved in the regulation of Tau phosphorylation at relevant sites. Hence, Pin1 dysfunction, unlikely by nuclear depletion, may have critical consequences on Tau pathological aggregation and neuronal death.
© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Alzheimer's disease; Neuronal differentiation; Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase; Tau phosphorylation

Introduction

Pin1 is a human peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase that recognizes a specific motif of a phosphorylated Ser or Thr residue preceding a Pro. Pin1 was first identified as a nuclear protein that regulates subset of mitotic and nuclear substrates (Lu et al., 1996; Yaffe et al., 1997; Shen et al., 1998). However, its function is likely not restricted to cell cycle control but is extended to multiple cellular processes such as transcription and apoptosis (for a review, see Lu, 2004). Recently, Pin1 was shown to be involved in tauopathies (Lu

et al., 1999; Ramakrishnan et al., 2003; Thorpe et al., 2004). The latter include a number of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease characterized by an aggregation of microtubule-associated Tau proteins into filaments. Mechanisms leading to this aggregation are still unknown. In the adult human brain, Tau proteins are found essentially in neurons and play important roles in the polymerization and stability of microtubules. Phosphorylation is the major post-translational modification that regulates Tau biological functions (Sengupta et al., 1998). At least 30 phosphorylation sites have been described in Tau proteins, 17 of which occur on Ser/Pro and Thr/Pro motives. Abnormal phosphorylation is found linked to Tau proteins aggregated into intracellular filamentous inclusions (for a review, see Buée et al., 2000). However, the effect of each individual phosphorylation site on Tau aggregation is not known.

The phosphorylation-dependent antibody TG-3 that recognizes conformation-dependent epitopes normally found in mitotic cells can visualize phosphorylated Tau aggregated into filaments (Vincent et al., 1996; Delobel et al., 2002). TG-3 epitope on Tau (pThr231) can be generated in degenerating neurons by p25–Cdk5 kinase complex (Hamdane et al., 2003). Interestingly, in vitro experiments showed that Pin1 mainly binds to pThr231 on Tau proteins (Lu et al., 1999; Wintjens et al., 2001; Hamdane et al., 2002). Likewise, in Pin1 knockout mice, Tau proteins are found hyperphosphorylated and aggregate into filaments (Liou et al., 2003). However, the role of Pin1 in the neurofibrillary degeneration process is still unclear, and there is no information on its physiological role in neurons (Hamdane et al., 2002; Holzer et al., 2002; Ramakrishnan et al., 2003; Thorpe et al., 2004).

Results

Pin1 level increases in neuronal cells

While increasing lines of evidence support Pin1 involvement in neurodegenerative diseases (Ramakrishnan et al., 2003; Thorpe et al., 2004; Segat et al., 2005), data regarding its physiological

* Corresponding author. Inserm, U815, Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, F-59045 Lille, France. Fax: +33 320 622079.

E-mail address: buée@lille.inserm.fr (L. Buée).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

expression, regulation and function in neuronal cells are lacking. In the present work, Pin1 was analyzed by immunoblotting during neuronal differentiation. In mixed neuron–glial cell cultures, Pin1 was increased from day 0 to day 11 (Figs. 1A and B). Co-immunostaining of Pin1 and the neuronal marker NeuN in primary cultures showed Pin1 expression in neurons in both cytoplasm and nucleus (Fig. 1C). To ascertain that the observed increase in Pin1 levels occurred in neuronal cells, protein expression was analyzed in differentiated SY5Y neuroblastoma cells as well as in neuronal hNT versus NT2 teratocarcinoma cells (Fig. 2A). After SY5Y neuronal differentiation, either with RA or NGF, an increase in Pin1 level was observed. The same results were shown following differentiation of NT2 into hNT neuronal cells. These data suggest that Pin1 has likely key function(s) during neuronal differentiation. It is worth noting that Pin1 increase was related to the differentiation state and not to treatment effects as shown in negative control experiments. Indeed, RA- or NGF-treated HeLa cells and SY5Y proliferating cells did not display any increase in Pin1 level, compared to untreated cells (Fig. 2B).

Since Pin1 binds to phospho-Tau, we further investigated tau phosphorylation during neuronal differentiation.

Pin1 is involved in specific Tau dephosphorylation

Tau expression and phosphorylation at some analyzed sites increase during neuronal differentiation (Smith et al., 1995; Haque

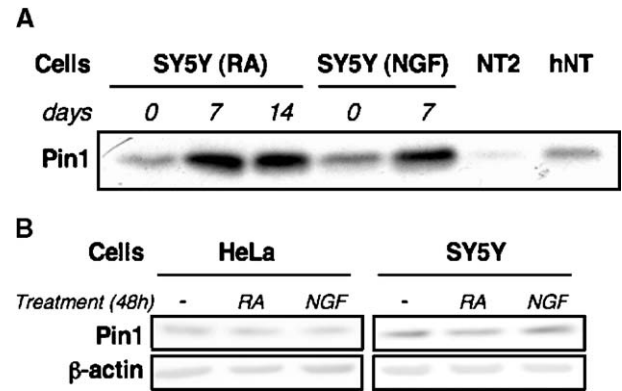


Fig. 2. (A) Representative immunoblot analysis of lysates from SY5Y proliferating cells (day 0) and differentiated ones (treatment with either retinoic acid (RA) or NGF); and from NT2 proliferating cells versus neuronal hNT cells; equal amounts of proteins are loaded. (B) Representative Western blot analysis of HeLa cells and undifferentiated proliferating SY5Y cells (negative controls of RA or NGF treatment effects on Pin1 expression).

et al., 1999). Here, extended analysis of Tau phosphorylation was performed in both SY5Y cells and hNT versus NT2 cells. We particularly focused on Thr231, which has been shown as the binding site for Pin1 that allows Tau dephosphorylation in vitro (Lu et al., 1999; Zhou et al., 2000). As expected, an increase in Tau

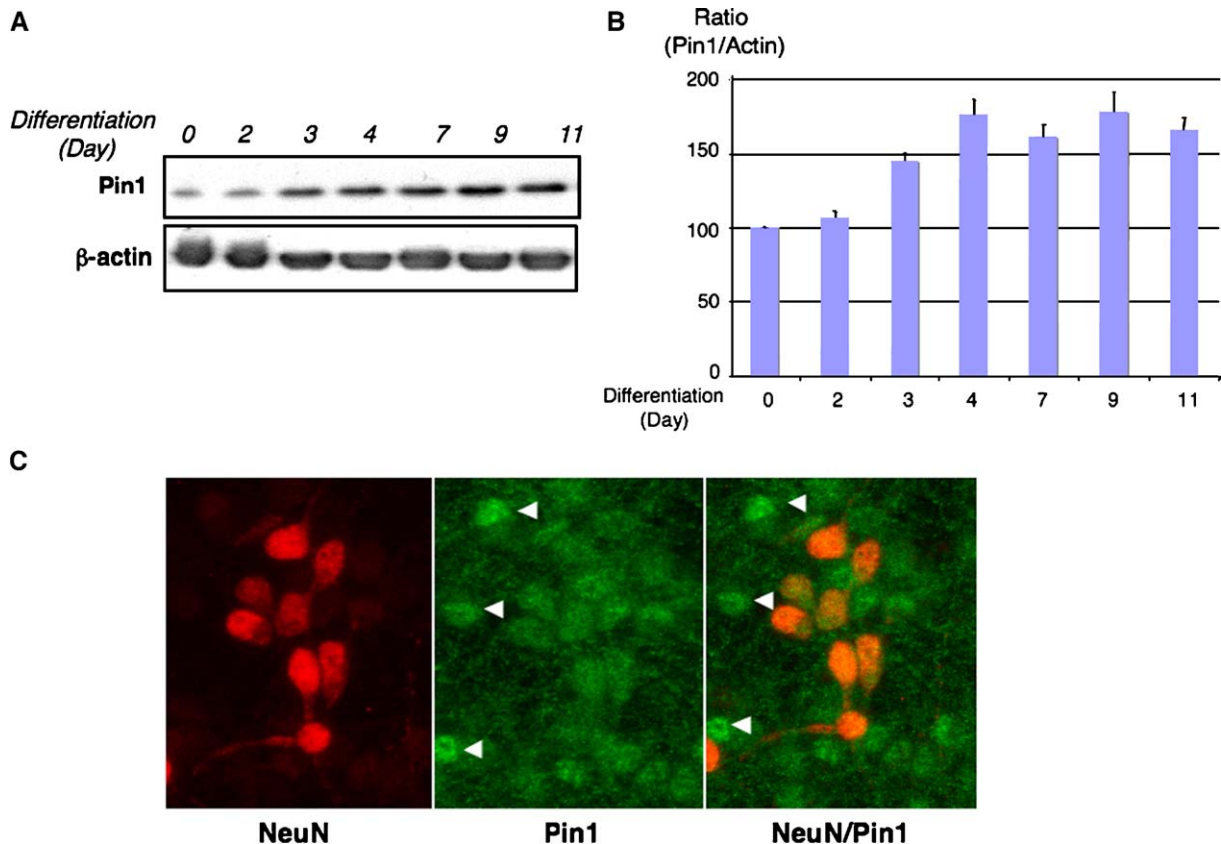


Fig. 1. Pin1 expression in primary cell cultures. (A) Immunoblotting analyses of Pin1 level during differentiation of rat primary cortical neurons (from day 0 to day 11). (B) Quantification of Pin1 level during differentiation; ratios of densitometric values of Pin1 immunoreactivity to that of β -Actin (loading control) are presented; ratio related to non-differentiated cells (day 0) has an arbitrary value = 100. (C) Double immunostaining of primary culture for Pin1 and NeuN. Non-neuronal cells (NeuN-negative) exhibited mostly a nuclear staining for Pin1 (green, arrowheads). In neurons (NeuN-positive cells (red)), Pin1 immunoreactivity was found in both cytosol and nucleus.

levels was observed in differentiated cells (Fig. 3A). Similarly, a parallel increase in Tau phosphorylation is shown at Ser396/404 and Thr181 sites. Conversely, phosphorylation at Thr231 remains as low as in proliferating cells even if total Tau levels strongly increased. Altogether, these data indicated a global decrease of phosphorylation at Thr231, whereas phosphorylation levels are not modified for the other sites (Thr181 and Ser396/404) (Fig. 3B). Since the levels of phospho-Thr231 are particularly low in native SY5Y cells, similar experiments were performed during neuronal differentiation of SY5Y cells overexpressing tau (Mailliot et al., 2000). These cells exhibit a basal pThr231 immunoreactivity (Delobel et al., 2002), and during differentiation, a clear decrease in phosphorylation was observed at Thr231 whereas other sites were not affected (data not shown). Hence, these analyses suggest a tight correlation between Pin1 increase and the specific Tau dephosphorylation at Thr231 during neuronal differentiation. To confirm this physiological observation, a Pin1-inducible SY5Y cell model was developed to examine Pin1 involvement in differential Tau dephosphorylation. In order to visualize phosphorylation at Thr231, SY5Y cells overexpressing Tau proteins (Mailliot et al., 2000; Delobel et al., 2002) were used as a basis for the establishment of tetracycline-inducible Pin1 cells. Immunoblotting analyses showed that, while no change was observed at pThr181 and pSer396/404, specific Tau dephosphorylation at pThr231 occurs following Pin1-induced expression (Figs. 3C and D). Altogether, these data demonstrate for the first time in cellular

context that Pin1 allows differential Tau dephosphorylation in neuronal-like cells.

Pin1 distribution is unchanged following abnormal Tau phosphorylation

In most cell lines, Pin1 localization was reported as mainly nuclear, but there is no information on Pin1 distribution in neuronal cell cultures (Lu et al., 1996; Thorpe et al., 1999, 2001; Rippmann et al., 2000). In normal human brain, Pin1 was localized by immunostaining in both cytoplasm and nucleus of neuronal cells, and it is assumed that Pin1 involvement in neurodegeneration is related to its nuclear depletion, subsequently to abnormal Tau phosphorylation (Lu et al., 1999; Thorpe et al., 2001; Liou et al., 2003). To test this hypothesis, we used well-characterized SY5Y-Tau cells that display inducible Cdk5 kinase activity. These differentiated cells allowed a specific Tau phosphorylation at Thr231 following expression of Cdk5 activator p25 protein (Fig. 4A and Hamdane et al., 2003). Pin1 cellular distribution in differentiated mock and p25-induced cells was analyzed by Western blotting. Proper fractionation of extracts was checked by analysis of cellular distribution of NSE and lamin B that showed cytoplasmic and nuclear immunoreactivity, respectively (Fig. 4B). In differentiated mock cells, Pin1 was found in both fractions with main localization in the cytoplasm, arguing again for a neuronal function that is not strictly related to its nuclear localization.

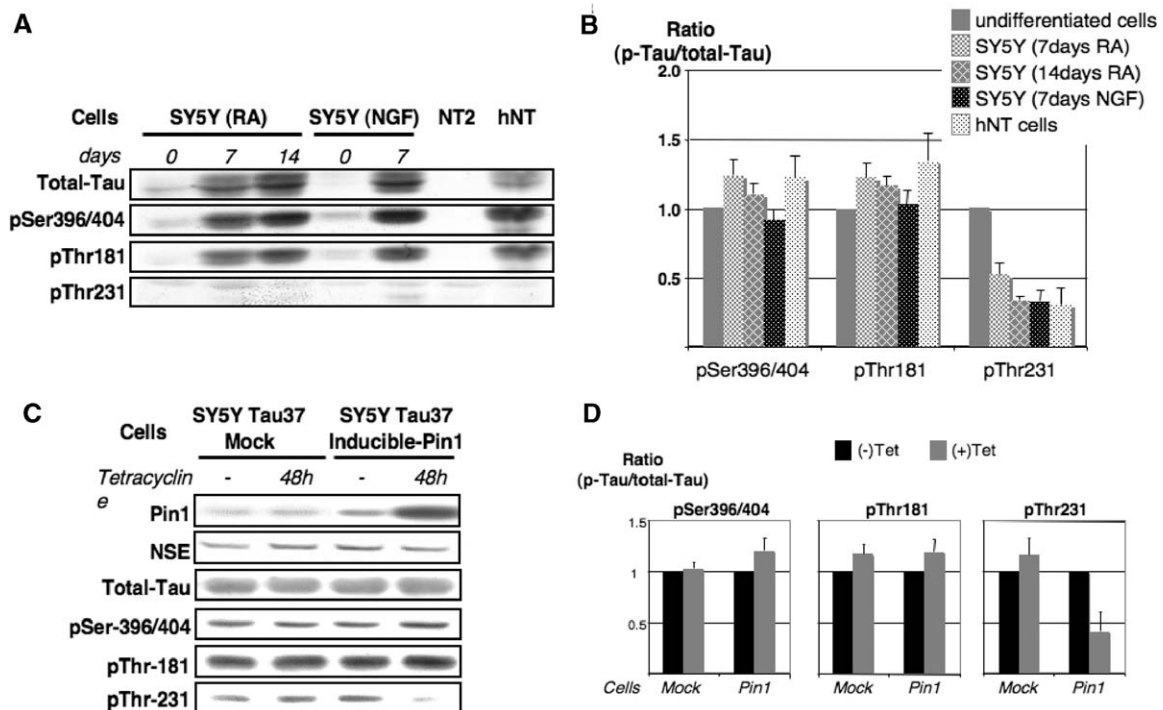


Fig. 3. Relationship between Pin1 and Tau phosphorylation. (A) Western blot analyses of Tau phosphorylation during neuronal differentiation of SY5Y cells (treatment with either RA or NGF) and NT2 into hNT cells, using phosphorylation-dependent Tau antibodies, followed after stripping by a phospho-independent antibody to visualize the amount of loaded Tau proteins. (B) Quantification of Tau phosphorylation during neuronal differentiation. Ratios of densitometric values of each phospho-Tau antibody to those of total-Tau antibody are presented. Ratios related to undifferentiated cells (SY5Y day 0 and NT2) have an arbitrary value = 1. (C) Analyses of Tau phosphorylation, as described above, following Pin1 overexpression in SY5Y-Tau cells. Western blots were performed with lysates from mock cells (Tet-on empty vector) and inducible-Pin1 cells (Tet-on vector with Pin1 cDNA), treated (48 h) or not (-) with tetracycline. Neuronal-specific γ -enolase (NSE) immunostaining is a loading control. (D) Quantification of Tau phosphorylation following Pin1-induced expression (+Tet), as described above. Ratios obtained from non-induced mock and Pin1 cells (-Tet) have an arbitrary value = 1.

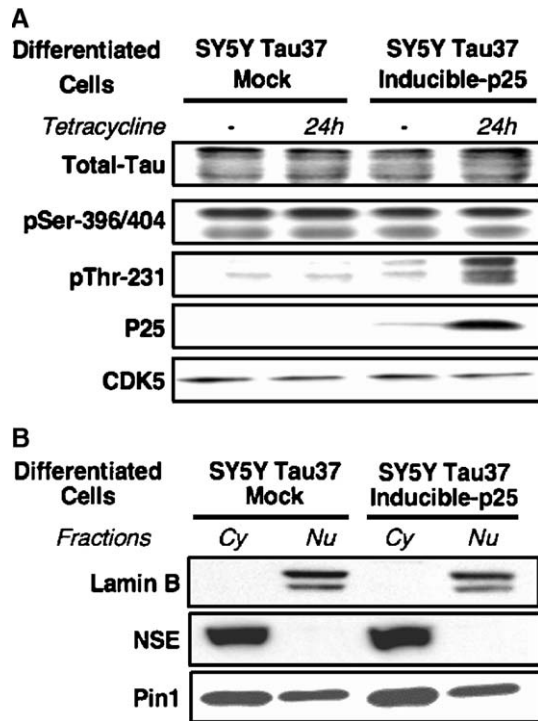


Fig. 4. Effect of Tau phosphorylation on Pin1 distribution. (A) Western blot analyses of lysates from differentiated mock cells (Tet-on empty vector) and inducible p25 cells, treated (24 h) or not (–) with tetracycline, showed a specific Tau phosphorylation at Thr231 subsequently to expression of CDK5 kinase activator p25 protein. (B) Cellular distribution of Pin1 following Tau phosphorylation at Thr231. Cytoplasmic and nuclear fractions were prepared from differentiated mock and inducible p25 cells, treated with tetracycline. Ten micrograms of cytoplasmic fractions (Cy) and an equivalent volume of nuclear fractions (Nu) (extracts were prepared from equal numbers of cells recovered in equal volumes of lysis buffers) were analyzed by immunoblotting. Antibodies against lamin B and NSE were used to evaluate the purity of nuclear and cytoplasmic fractions, respectively.

Moreover, Tau phosphorylation at Thr231 did not induce any change in cellular distribution of Pin1 since the same pattern was shown in p25-induced and mock cells.

Discussion

Pin1 was widely studied in proliferating cells and in the field of cancer. Recently, its implication in Alzheimer's disease raised its likelihood to assume key function(s) in neuron. Nevertheless, knowledge on Pin1 biology in neuronal cells is lacking, and then studies in this purpose are necessary to give an insight into mechanisms leading to neurofibrillary degeneration. In the present work, we showed that Pin1 protein level increased in neuronal cells. These data suggest that Pin1 may be a key actor in neuronal differentiation and probably assumes crucial functions. Likewise, it is interesting to note, by using MatInspector, that Pin1 promoter has a number of consensus sequences related to brain and/or neuronal differentiation including MEF2, MyT1 and TG-interacting factor (Quandt et al., 1995). Furthermore, in a recent study, Pin1 was found as 1 of the 381 genes expressed in different brain regions at least three-fold higher than in other tissues (Zhang et al., 2004). The importance of Pin1 neuronal function(s) is supported

by number pieces of evidence arguing for a loss of Pin1 function in neurofibrillary degeneration related to Alzheimer's disease (Lu et al., 1999; Liou et al., 2003; Thorpe et al., 2004; Segat et al., 2005; Sultana et al., 2006).

Among neuronal functions, Pin1 is likely to be a regulator of Tau phosphorylation. Indeed, in vitro experiments showed that Pin1 binds to pThr231 and promotes Tau dephosphorylation via PP2A (Lu et al., 1999; Zhou et al., 2000; Wintjens et al., 2001). In the present work, we demonstrated for the first time in cellular systems a link between Pin1 expression and Tau dephosphorylation. More interestingly, this dephosphorylation did not occur systematically at any p(Ser/Thr)-Pro motif but rather specifically at pThr231. The latter is likely an early marker of neurofibrillary degeneration (Vincent et al., 1998; Augustinack et al., 2002; Ramakrishnan et al., 2003) and is mainly targeted by p25–Cdk5 kinase complex that seems to be involved in neurodegeneration (Cruz et al., 2003; Hamdane et al., 2003; Noble et al., 2003). Hence, Tau phosphorylation at this relevant site may be tightly regulated, and beside kinases and phosphatases, Pin1 provides another level of regulation that may circumvent any imbalance between phosphorylation and dephosphorylation that likely promotes Tau aggregation. Indeed, we previously showed that abnormal Tau phosphorylation at Thr231 by p25–Cdk5 kinase complex did not induce any aggregation (Hamdane et al., 2003). We hypothesized that abnormal Tau phosphorylation is a prerequisite and that additional events are needed to promote Tau aggregation. However, Pin1 has likely broadest function(s) in neuron, and identifying its neuronal substrates will usefully allow understanding of Pin1 role in neurodegeneration. In Alzheimer's disease, Pin1 may have some loss of function that could be related to either a decrease in Pin1 amount or a subcellular mis-targeting (Lu et al., 1999, 2003; Liou et al., 2003; Thorpe et al., 2004; Segat et al., 2005; Sultana et al., 2006). Our biochemical analyses of cellular distribution showed that Pin1 is mainly localized in the cytoplasm of neuronal cells. Furthermore, abnormal Tau phosphorylation at Thr231 did not allow any change in Pin1 cellular distribution, arguing against the hypothesis of Pin1 nuclear depletion following Tau abnormal phosphorylation. Hence, if Pin1 dysfunction occurs in AD, it may be related to the low amount of available Pin1 in brain-affected regions (Liou et al., 2003; Segat et al., 2005) or to its inactivation by any post-translational modification such as phosphorylation or oxidation (Wulf et al., 2001; Lu et al., 2002; Sultana et al., 2006), hence making it impossible to overcome molecular consequences of abnormal Tau phosphorylation. However, we cannot rule out the possibility that phosphorylated Tau during the onset of neurodegeneration may serve as a sink for Pin1, hence sequestering it away from relevant physiological cytoplasmic substrates. In conclusion, compiling data on Pin1 biology in neuronal cells are needed to clarify mechanisms of its involvement in neurodegeneration and to better evaluate its potential as a therapeutic target.

Experimental methods

Western blotting and antibodies

Cells were harvested as previously described (Hamdane et al., 2003), and protein concentration was determined by BCA protein assay kit (Pierce Perbio Science, France). Samples were mixed with an equal volume of 2× Laemmli buffer and DTT, heated 5 min at 100°C and then 10–20 μg was

loaded onto SDS-PAGE gel. After transfer, membranes were blocked in Tris-buffered saline, pH 8, 0.05% Tween-20, with 5% skim milk, and incubated with primary antibody. All Tau phosphorylation-dependent antibodies recognize (Ser/Thr)-Pro sites: AD2 against pSer396/404 (Buée-Scherrer et al., 1996), AT180 against pThr231 and AT270 against pThr181 (Innogenetics, Ghent, Belgium). M19G recognizes Tau independently of its phosphorylation state (Buée-Scherrer et al., 1996). Antibodies directed against Pin1 (H-123), Cdk5 (J-3), p35 C-terminus that also recognizes p25 protein (C-19), lamin B (H-90) and neuronal-specific γ -enolase were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, France). Anti β -Actin (Ac-15) was purchased from Sigma and anti-neuronal nuclei (NeuN) from Chemicon (MAB377). Horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated antibody (Sigma) was used as secondary antibody, and HRP activity was detected with ECL detection kit (Amersham Biotech, France).

Cytoplasmic and nuclear fractionation

Cells were harvested and proceeded as previously described (Hamdane et al., 2005).

Cell culture and differentiation

NT2 teratocarcinoma cell line was differentiated into hNT using retinoic acid and mitotic inhibitors as described (Ferreira et al., 2000). NT2 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and penicillin–streptomycin mix. Differentiation was performed according to Stratagene's protocol. Briefly, cells were maintained for 4–5 weeks in the culture medium with 10 μ M retinoic acid (RA) (Sigma, St Louis, MO). Afterward, cells were replated at dilution 1/4 and, 2 days later, treated with a mitotic inhibitor mix (10 μ M 5-fluoro-29-deoxyuridine, 10 μ M uridine, 1 μ M cytosine- β -D-arabinofuranoside), in the absence of retinoic acid, for 2 additional weeks. At last, by mild trypsinization enrichment protocol, the cellular population was divided into two cellular groups enriched either in non-neuronal (NN) or neuronal (hNT) cells.

HeLa cells and native SY5Y human neuroblastoma cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM non-essential amino acids and penicillin–streptomycin in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C. For differentiation, SY5Y cells were maintained in DMEM/F12 with either 1 μ M RA for 7–14 days or NGF as previously described (Hamdane et al., 2003).

Primary cell culture

Primary cortical neurons were obtained from 17- to 18-day-old Wistar rat embryos and prepared as follows. Briefly, brain and meninges were removed. Cortex was carefully dissected out and mechanically dissociated in culture medium by trituration with a polished Pasteur pipette. Once dissociated and after blue trypan counting, cells were plated in 24-well plates or 25 cm² flasks at a density of 900 cells/mm². For dissociation, plating and maintenance, Neurobasal medium supplemented with 1% B27, 200 mM glutamine and 1% antibiotic–antimycotic agent (Gibco, France) was used. To prepare cell lysates, cells are scrapped in NuPAGE sample buffer (Invitrogen, France).

Immunocytochemistry

Primary cultures were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min and permeabilized in 0.25% Triton X100 for 5 min. After 30 min of saturation in 4% BSA, double immunostaining was performed using anti-Pin1 and NeuN antibodies. Pin1 staining was revealed with a goat anti-rabbit IgG (H + L) antibody coupled to Alexa Fluor®488 and NeuN with a goat anti-mouse IgG (H + L) antibody coupled to Alexa Fluor®568 (Molecular Probes). Slides were analyzed by a Leica TCS NT confocal laser scanning microscope.

Stable transfections of SY5Y neuroblastoma cells

As described for p25-inducible cell line (Hamdane et al., 2003), Tau-SY5Y cells that stably overexpress 2 + 3–10 tau isoform (Tau37) were used as the basis for the T-Rex system (Invitrogen) allowing inducible Pin1 overexpression. Pin1 cDNA was obtained from Pr. Peter Davies (AECOM, Bronx, USA) and subcloned in pcDNA4TO (Invitrogen). Induction of Pin1 overexpression is allowed by maintaining cell in medium with tetracycline (1 μ g/ml).

Acknowledgments

These studies were supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), University of Lille 2, French Research and Foreign Affairs Ministries (fellowship to PD, AB and KA), grants from Institute for the Study of Aging, the European Community (APOPIS, LSHM-CT-2003-503330), the “Région Nord-Pas-de-Calais” (Géropole de Lille), the GIS Longévité and the F.E.D.E.R.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.mcn.2006.03.006.

References

- Augustinack, J.C., Schneider, A., Mandelkow, E.M., Hyman, B.T., 2002. Specific Tau phosphorylation sites correlates with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 103, 26–35.
- Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
- Buée-Scherrer, V., Condamines, E., Mourton-Gilles, C., Jakes, R., Goedert, M., Pau, B., Delacourte, A., 1996. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol. Brain Res.* 39, 79–88.
- Cruz, J.C., Tseng, A.C., Goldman, J.A., Shih, H., Tsai, L.H., 2003. Aberrant cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40, 471–483.
- Delobel, P., Flament, S., Hamdane, M., Mailliot, C., Sambo, A.V., Bégard, S., Sergeant, N., Delacourte, A., Vilain, J.P., Buee, L., 2002. Abnormal Tau phosphorylation of the Alzheimer-type also occurs during mitosis. *J. Neurochem.* 83, 412–420.
- Ferreira, S., Dupire, M.J., Delacourte, A., Najib, J., Caillet-Boudin, M.L., 2000. Synthesis and regulation of apolipoprotein E during the differentiation of human neuronal precursor NT2/D1 cells into postmitotic neurons. *Exp. Neurol.* 166, 415–421.
- Hamdane, M., Smet, C., Sambo, A.V., Leroy, A., Wieruszkeski, J.M., Delobel, P., Maurage, C.A., Ghestem, A., Wintjens, R., Bégard, S., Sergeant, N., Delacourte, A., Horvath, D., Landrieu, I., Lippens, G., Buée, L., 2002. Pin 1 a therapeutic target in Alzheimer neurodegeneration. *J. Mol. Neurosci.* 19, 275–287.
- Hamdane, M., Sambo, A.V., Delobel, P., Bégard, S., Violleau, A., Delacourte, A., Bertrand, P., Benavides, J., Buée, L., 2003. Mitotic-like Tau phosphorylation by p25–Cdk5 kinase complex. *J. Biol. Chem.* 278, 34026–34034.

- Hamdane, M., Bretteville, A., Sambo, A.V., Schindowski, K., Bégard, S., Delacourte, A., Bertrand, P., Buée, L., 2005. p25/Cdk5-mediated retinoblastoma phosphorylation is an early event in neuronal cell death. *J. Cell Sci.* 118, 1291–1298.
- Haque, N., Tanaka, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 1999. Regulation of expression, phosphorylation and biological activity of tau during differentiation in SY5Y cells. *Brain Res.* 838, 69–77.
- Holzer, M., Gartner, U., Stobe, A., Hartig, W., Gruschka, H., Bruckner, M.K., Arendt, T., 2002. Inverse association of Pin1 and tau accumulation in Alzheimer's disease hippocampus. *Acta Neuropathol. (Berl)* 104, 471–481.
- Liou, Y.C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X.Z., Yu, Z.X., Huang, H.K., Bronson, R., Bing, G., Li, X., Hunter, T., Lu, K.P., 2003. Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* 424, 556–561.
- Lu, K.P., 2004. Pinning down cell signalling, cancer and Alzheimer's disease. *Trends Biochem. Sci.* 29, 200–209.
- Lu, K.P., Hanes, S.D., Hunter, T., 1996. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380, 544–547.
- Lu, P.J., Wulf, G., Zhou, X.Z., Davies, P., Lu, K.P., 1999. The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399, 784–788.
- Lu, P.J., Zhou, X.Z., Liou, Y.C., Noel, J.P., Lu, K.P., 2002. Critical role of WW domain phosphorylation in regulating phosphoserine binding activity and Pin1 function. *J. Biol. Chem.* 277, 2381–2384.
- Lu, K.P., Liou, Y.C., Vincent, I., 2003. Proline-directed phosphorylation and isomerization in mitotic regulation and in Alzheimer's disease. *BioEssays* 25, 174–181.
- Mailliot, C., Bussièrre, T., Hamdane, M., Sergeant, N., Caillet-Boudin, M.L., Delacourte, A., Buée, L., 2000. Pathological tau phenotypes: the weight of mutations, polymorphisms and differential neuronal vulnerabilities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 920, 107–114.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancis, J., Wang, L., Kondo, T., Davies, P., Burns, M., Nixon, R., Dickson, D., Matsuoka, Y., Ahlijanian, M., Lau, L.F., Duff, K., 2003. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangles formation in vivo. *Neuron* 38, 555–565.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T., 1995. MatInd and MatInspector—New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23, 4878–4884.
- Ramakrishnan, P., Dickson, D.W., Davies, P., 2003. Pin1 colocalization with phosphorylated tau in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Neurobiol. Dis.* 14, 251–264.
- Rippmann, J.F., Hobbie, S., Daiber, C., Guilliard, B., Bauer, M., Birk, J., Nar, H., Garin-Chesa, P., Rettig, W.J., Schnapp, A., 2000. Phosphorylation dependent proline isomerisation catalysed by Pin 1 is essential for tumor cell survival and entry into mitosis. *Cell Growth Differ.* 11, 409–416.
- Segat, L., Pontillo, A., Annoni, G., Trabattoni, D., Vergani, C., Clerici, M., Arosio, B., Crovella, S., 2005. Pin1 promoter polymorphisms are associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* (Dec 27, electronic publication ahead of print).
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1998. Phosphorylation of Tau at both Thr231 and Ser262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch. Biochem. Biophys.* 357, 299–309.
- Shen, M., Stukenberg, P.T., Kirschner, M.W., Lu, K.P., 1998. The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* 12, 706–720.
- Smith, C.J., Anderton, B.H., Davis, D.R., Gallo, J.M., 1995. Tau isoform expression and phosphorylation state during differentiation of cultured neuronal cells. *FEBS Lett.* 375, 243–248.
- Sultana, R., Poon, H.F., Cai, J., Pierce, W.M., Merchant, M., Klein, J.B., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A., 2006. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol. Dis.* 22, 76–87.
- Thorpe, J.R., Rulten, S.L., Kay, J.E., 1999. The binding of a putative and a known chaperone protein revealed by immunogold labelling transmission electron microscopy: a suggested use of chaperones as probes for the distribution of their target proteins. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1633–1640.
- Thorpe, J.R., Morley, S.J., Rulten, S.L., 2001. Utilising the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase Pin 1 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.
- Thorpe, J.R., Mosaheb, S., Hashemzadeh-Bonehi, L., Cairns, N.J., Kay, J.E., Morley, S.J., Rulten, S.L., 2004. Shortfalls in the peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase protein Pin 1 in neurons are associated with frontotemporal dementias. *Neurobiol. Dis.* 17, 237–249.
- Vincent, I., Rosado, M., Davies, P., 1996. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J. Cell. Biol.* 132, 413–425.
- Vincent, I., Zheng, J.H., Dickson, D.W., Kress, Y., Davies, P., 1998. Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 19, 287–296.
- Wintjens, R., Wieruszkeski, J.M., Drobecq, H., Rousselot-Pailley, P., Buée, L., Lippens, G., Landrieu, I., 2001. 1H NMR study on the binding of Pin1 WW domain with phosphothreonine peptides. *J. Biol. Chem.* 276, 25150–25156.
- Wulf, G.M., Ryo, A., Wulf, G.G., Lee, S.W., Niu, T., Petkova, V., Lu, K.P., 2001. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *EMBO J.* 20, 3459–3472.
- Yaffe, M.B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X.Z., Stukenberg, P.T., Rahfeld, J.U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M.W., Fischer, G., Cantley, L.C., Lu, K.P., 1997. Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278, 1957–1960.
- Zhang, J., Moseley, A., Jegga, A.G., Gupta, A., Witte, D.P., Sartor, M., Medvedovic, M., Williams, S.S., Ley-Ebert, C., Coolen, L.M., Egnaczyk, G., Genter, M.B., Lehman, M., Lingrel, J., Maggio, J., Parysek, L., Walsh, R., Xu, M., Aronow, B.J., 2004. Neural system-enriched gene expression: relationship to biological pathways and neurological diseases. *Physiol. Genomics* 18, 167–183.
- Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G., Lu, K.P., 2000. Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol. Cell* 6, 873–883.

2.4.3 Conclusions

2.4.3.1 *Pin1 augmente au cours de la différenciation neuronale*

Alors que dans les cellules en prolifération, Pin1 semble avoir une localisation principalement nucléaire, son expression et sa localisation subcellulaire dans des cellules neuronales n'étaient pas documentées. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à l'expression de Pin1 dans des cellules neuronales. Pour répondre à cet objectif, nous avons tout d'abord étudié l'expression de Pin1 au cours de la différenciation dans deux lignées cellulaires humaines différenciables en cellules de type neuronal (SH-SY5Y et NT2). L'analyse de ces résultats nous montre clairement que le taux de protéine Pin1 augmente au cours du processus de différenciation, et ceci, dans les deux lignées et par deux méthodes de différenciation différentes (traitement NGF et acide rétinoïque) (Figure 2 de l'article). Finalement, afin de confirmer ces résultats dans un modèle plus physiologique, nous avons étudié cette expression de Pin1 au cours de la différenciation neuronale dans des cultures primaires mixtes de neurones de souris. L'analyse des résultats nous montre, comme attendu, que le taux d'expression de Pin1 augmente également au cours de la différenciation des neurones en culture (Figure 1 de l'article).

2.4.3.2 *Pin1 entraîne une déphosphorylation de Tau spécifiquement à la Thr231*

Des études précédentes ayant montrées *in vitro* que Pin1 pouvait interagir avec Tau au niveau de la pT231 et faciliter sa déphosphorylation, nous nous sommes intéressés, au cours de la différenciation neuronale, à l'effet de cette augmentation de Pin1 sur la phosphorylation de Tau. Les résultats des analyses par immunoempreintes dirigées contre plusieurs sites de phosphorylation de Tau de type pS/P-pT/P (pT231, pS396/pS404, pT181) ont montré que seule la pT231 présentait une baisse de son état de phosphorylation au cours du processus de différenciation. Afin de confirmer le rôle direct de Pin1 dans cette déphosphorylation spécifique de Tau, notre laboratoire a développé un modèle cellulaire permettant la surexpression inducible de Pin1. L'analyse de la phosphorylation de Tau aux sites précédemment étudiés, dans ce système, a confirmé les résultats précédents et a montré que seule la pT231 était déphosphorylée suite à l'induction de la surexpression de Pin1.

En résumé, ce travail montre que Pin1 augmente au cours de la différenciation neuronale et suggère un rôle particulier de Pin1 dans les neurones. Nous montrons également pour la première fois dans un système cellulaire que Pin1 est capable de faciliter la déphosphorylation de Tau. Mais de façon plus importante, nous montrons que Pin1 agirait de façon spécifique sur certains sites de phosphorylation de Tau puisque seul le site de pT231 semble être affecté par Pin1. Ce résultat, relié aux données de la littérature montrant l'implication de Pin1 dans la MA et les Tauopathies (pour revue (Butterfield *et al.*, 2006), est important puisque la phosphorylation de la Thr231 apparaît comme un événement précoce au cours de la DNF (Augustinack *et al.*, 2002). Il est possible alors d'émettre l'hypothèse qu'une perte de fonction précoce de Pin1 dans la MA, soit par une diminution d'expression (Segat *et al.*, 2007) soit par son oxydation (Sultana *et al.*, 2006) pourrait mener à l'accumulation de ces protéines Tau phosphorylées à la pT231. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions envisager d'étudier l'effet de l'invalidation de Pin1, dans nos modèles cellulaires présentant une phosphorylation anormale à la Thr231 ou un état particulier de phosphorylation favorisé par des mutations de Tau, sur le devenir de ces protéines Tau anormalement modifiées et la viabilité neuronale.

Discussion

Discussion

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude des mécanismes impliqués dans la mort neuronale observée dans les Tauopathies et plus particulièrement la MA. En effet, si l'on observe, dans un grand nombre de maladies neurodégénératives, des lésions formées de l'agrégation de protéines particulières, l'étiopathologie de ces maladies reste encore mal comprise. Tel est le cas des Tauopathies, un ensemble de maladies neurodégénératives qui présentent une agrégation intra-neuronale de protéines Tau qui sont retrouvées hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées. Cependant, le rôle de cette dérégulation de la phosphorylation de Tau au cours du processus dégénératif est encore mal compris. Ainsi, de nombreux points restent à préciser quant à l'implication de cette dérégulation dans la fibrillogénèse de Tau et le rôle de cette phosphorylation dans la mort neuronale. De la même façon, la relation existante entre agrégation de Tau et mort neuronale est encore loin d'être élucidée. Au cours de ce travail, nous nous sommes orientés vers le développement et l'étude de modèles expérimentaux destinés à reproduire certaines des caractéristiques observées au cours de la dégénérescence neurofibrillaire (DNF), afin d'étudier les mécanismes impliqués dans cette cascade délétère.

1 Mécanismes à l'origine de l'agrégation de Tau : Rôle de la phosphorylation ?

Concernant ces mécanismes, l'étude du rôle de la dérégulation de la phosphorylation de Tau, un événement précoce au cours de son agrégation et de la mort neuronale, apparaît donc comme un point crucial à la compréhension de l'étiopathologie de la DNF. En effet, à ce jour, le rôle de la phosphorylation au regard de l'agrégation de Tau est encore controversé. Ainsi, certaines études ont suggéré que des protéines Tau s'agrégeaient rapidement *in vitro* quand elles étaient hyperphosphorylées et que ce phénomène était aboli après déphosphorylation (Alonso *et al.*, 2001). Ces données ont été également appuyées par le fait qu'*in vivo*, l'augmentation pathologique des activités kinasiques Cdk5 (Noble *et al.*, 2003) et GSK3- β (Engel *et al.*, 2006c) entraînait une potentialisation de l'agrégation de Tau dans des modèles murins qui présentent déjà une DNF, suggérant, par la même, un lien étroit entre phosphorylation et agrégation de Tau. Cependant, si l'augmentation *in vivo* de l'activité kinasique Cdk5 semble capable, à elle seule, d'initier la fibrillogénèse de Tau (Cruz *et al.*,

2003), la surexpression de la kinase GSK3- β , en revanche, ne semble pas suffisante (Brownlee *et al.*, 1997; Lucas *et al.*, 2001; Spittaels *et al.*, 2000). Ces données associées au fait que la phosphorylation de Tau apparaît comme un processus séquentiel au cours de la DNF avec l'apparition précoce de certains épitopes (par opposition à d'autres épitopes plus tardifs) (Augustinack *et al.*, 2002), suggèrent que les différents épitopes de phosphorylation de Tau pourraient avoir une contribution spécifique et différente au cours du processus agrégatif de Tau. Cette hypothèse est appuyée par des données *in vitro* qui montrent que des mutants artificiels de Tau mimant une pseudo-phosphorylation (remplacement des sites de phosphorylation par des glutamates) sur des épitopes carboxy-terminaux favorisent l'agrégation de Tau, en présence d'inducteurs d'agrégation. A l'opposé, la pseudo-phosphorylation de sites situés dans le domaine amino-terminal aurait une action opposée (Haase *et al.*, 2004). Ainsi, on pourrait envisager que l'apparition précoce d'épitopes spécifiques de phosphorylation serait un reflet de la contribution relative de ces épitopes aux phases précoces de l'agrégation de Tau : « la nucléation ». L'apparition plus tardive d'autres sites de phosphorylation pourrait en revanche catalyser l'extension de l'agrégation de Tau. Pour préciser le lien entre phosphorylation et agrégation de Tau et l'implication particulière de sites de phosphorylation spécifiques, nous avons cherché à modéliser les événements moléculaires allant de la phosphorylation de Tau à son agrégation. Ainsi, le développement d'un modèle *in vivo*, basé sur la surexpression de protéines Tau comportant des mutations pathologiques, nous a permis de modéliser une séquence d'événements présentant l'ensemble des éléments caractéristiques de la DNF tels que l'hyperphosphorylation et la phosphorylation anormale de Tau, l'agrégation de Tau, une perte neuronale dans l'hippocampe des souris et finalement l'apparition de troubles de mémoires associés. Dans ce modèle, nous avons pu observer que la phosphorylation de Tau apparaît de façon concomitante ou devance l'agrégation suivant les sites de phosphorylation analysés. Ces résultats suggèrent ainsi que certains sites de phosphorylation pourraient être un pré-requis à l'agrégation de Tau. Cependant, la complexité physiopathologique de ce modèle nous a conduit à développer/utiliser, en parallèle, des modèles cellulaires simples et plus aisés d'exploitation. Ces modèles ont été choisis de façon soit à présenter un état de phosphorylation de Tau particulier, par le biais de la surexpression du complexe kinasique p25/Cdk5 soit à surexprimer des mutants pathologiques de Tau. Ainsi, l'analyse de nos lignées surexprimant des protéines Tau mutées montrent que deux mutations différentes (P301S/S305N) peuvent induire des changements de conformation (caractérisés par une augmentation de la masse

moléculaire apparente des protéines Tau mutées) détectés par électrophorèse bidimensionnelle. Nous avons également montré que ce changement de conformation était directement lié à un état de phosphorylation particulier puisque la déphosphorylation *in vitro* des protéines Tau mutées abolit le changement de conformation observé. A ce jour, la nature des sites de phosphorylation impliqués dans ces changements de conformation nous reste encore inconnue. L'analyse dans nos modèles cellulaires par une approche monodimensionnelle de certains épitopes de phosphorylation de Tau, majoritairement dérégulés dans les Tauopathies, ne nous a pas indiqué ni la présence d'une hyperphosphorylation ni celle d'une phosphorylation anormale. En outre, si nous n'avons pas observé d'agrégation de Tau, à proprement parlé dans nos modèles cellulaires, nous avons pu montrer que le changement d'état de phosphorylation des protéines Tau mutées, mis en évidence par analyse bidimensionnelle, était corrélé à l'apparition de structures denses en microscopie électronique. Ces structures rappellent des éléments appelés « foyers de nucléation », précédemment décrits dans la littérature comme pouvant être à l'origine de la formation, plus tardive, d'agrégats de Tau structurés sous la forme de filaments (DeTure *et al.*, 2002a). Actuellement, la nature de ce changement particulier de l'état de phosphorylation des protéines Tau qui semble être favorisé par les mutations n'est pas encore connue. Néanmoins, et par extrapolation, nous émettons l'hypothèse que dans la MA où aucune mutation de Tau n'a été détectée, des changements précoces de l'état de phosphorylation de Tau (suite à des mécanismes cellulaires bouleversant la régulation de l'homéostasie de sa phosphorylation) conduiraient à ces mêmes changements de conformation particuliers qui pourraient être à la base de l'initiation de la fibrillogénèse des protéines Tau.

Parmi les sites de phosphorylation dérégulés, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la phosphorylation de Tau à la Thr231 qui semble être un événement précoce au cours de la DNF (Augustinack *et al.*, 2002). Dans ce cadre, nous avons cherché à évaluer l'importance de la phosphorylation de cet épitope dans l'agrégation de Tau à l'aide de notre modèle cellulaire p25/Cdk5, capable de générer cet épitope de phosphorylation anormale (Hamdane *et al.*, 2003b). Nous avons ainsi montré que la présence d'une phosphorylation à cet épitope, à elle seule, ne semble pas suffisante, dans notre modèle, pour mener à une insolubilité de Tau et, *a fortiori*, à sa fibrillogénèse.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats associés à une liste assez longue de travaux menés dans des modèles cellulaires basés soit sur la surexpression de kinases soit sur une inhibition de la phosphatase PP2A montre que ni l'hyperphosphorylation, ni la phosphorylation

anormale de Tau ([Tableau 2, p.18](#)) (Bussiere *et al.*, 1999; Caillet-Boudin and Delacourte, 1996; Mailliot *et al.*, 1998) ne semblent suffisantes pour mener à sa fibrillogenèse. De plus, à côté de ces modèles cellulaires, on peut noter également qu'une dérégulation de la phosphorylation de Tau est également retrouvée *in vivo* dans des conditions physiologiques particulières telles que l'hypothermie induite par hypoglycémie (Planel *et al.*, 2004) ou anesthésie (Planel *et al.*, 2007) et dans les neurones hippocampiques de *spermophilus citellus* (Arendt *et al.*, 2003) et *Mesocricetus auratus* (Hartig *et al.*, 2005; Hartig *et al.*, 2007) en conditions d'hibernation, où aucune agrégation de Tau n'a été observée à ce jour.

Néanmoins, l'analyse comparative de nos modèles cellulaires présentant deux phénotypes différents, à savoir : d'un côté, une phosphorylation anormale de Tau sans agrégation ni insolubilité, et de l'autre, un changement particulier de l'état de phosphorylation des protéines Tau mutées, associé à des changements de conformation et à la formation de « foyers de nucléation », nous permet d'émettre l'hypothèse que la phosphorylation de Tau ne pourrait jouer un rôle vis-à-vis de son agrégation que par sa dimension combinatoire et séquentielle. En effet, des données obtenues sur d'autres protéines comme l'histone H1 montrent que seul le regroupement de groupements phosphate dans une région particulière de la protéine sous forme de « clusters de phosphorylation » est capable de changer la conformation locale de la protéine et d'entraîner son dépliement (Lindwall and Cole, 1984b). Concernant Tau, des études ultra-structurales ont pu montrer que la région impliquée dans les interactions intermoléculaires au sein des agrégats, encore appelée « domaine core », est contenue dans les domaines de répétition R2 et R3 (von Bergen *et al.*, 2005). En outre, cette région basique de Tau ([Figure 2, p.10](#)) est également capable de réaliser des interactions intramoléculaires avec le domaine amino-terminal de Tau (Carmel *et al.*, 1996) et la queue carboxy-terminale de Tau qui présentent, tous deux, des pHi acides (Esposito *et al.*, 2000). La réalisation de telles interactions serait alors défavorable à l'agrégation de Tau puisque le « domaine core » de la protéine se trouverait masqué au sein de cette structure conformationnelle (Berry *et al.*, 2003). Ces données structurales expliqueraient, en partie, la raison pour laquelle des protéines Tau ne présentant plus d'extrémité carboxy-terminale, après clivage protéolytique réalisé par la Caspase-3, pourraient être engagées dans les agrégats de Tau (Gamblin *et al.*, 2003; Rissman *et al.*, 2004). Ces données expliquerait également pourquoi la surexpression de constructions de Tau restreintes aux domaines de répétition entraîne leur agrégation rapide dans des modèles cellulaires, et ceci, par opposition à la

protéine Tau entière (Khlistunova *et al.*, 2006). C'est dans ce contexte que la phosphorylation de Tau dans sa partie carboxy-terminale pourrait agir en tant qu'agent facilitateur de l'agrégation. En effet, le regroupement de groupements phosphate dans cette partie de la protéine pourrait faciliter, un dépliement de la protéine (par repoussement de charges avec les extrémités terminales acides) et permettre une meilleure exposition du « domaine core » de Tau pour ses liaisons intermoléculaires (Figure 20, p.86) et la formation de « foyers de nucléations ». La détermination des sites de phosphorylation impliqués dans des changements de conformation, comme ceux observés dans nos modèles cellulaires surexprimant des protéines Tau mutées, représenterait alors des perspectives intéressantes pour identifier les épitopes critiques impliqués dans la formation de ces « foyers de nucléations ».

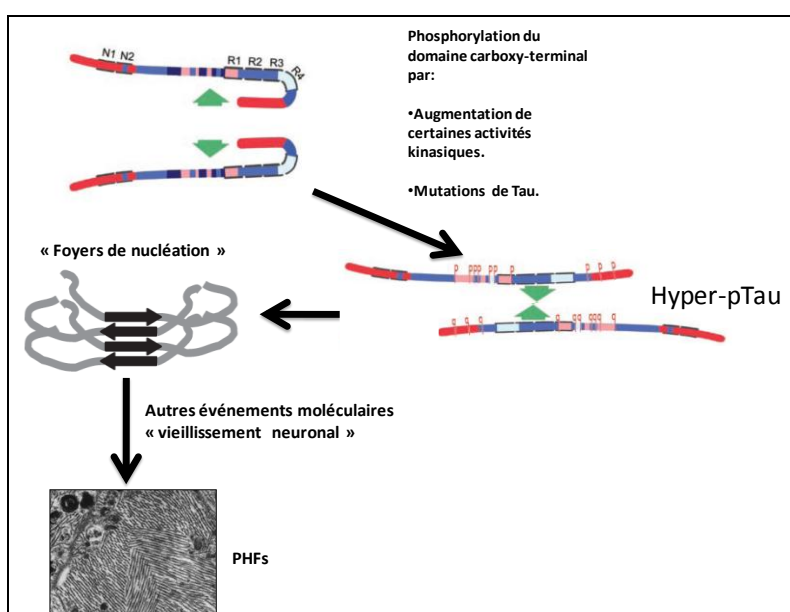


Figure 20 : Représentation schématique d'une hypothèse de mécanisme d'action de la phosphorylation sur la formation de « foyers de nucléation » adaptée de (Alonso Adel *et al.*, 2004)

Hormis cette hypothèse du rôle de la phosphorylation séquentielle et combinatoire pour expliquer le lien entre la phosphorylation de Tau et son agrégation, l'idée que d'autres mécanismes moléculaires pourraient être nécessaires à la fibrillogénèse de Tau dans les systèmes biologiques n'est pas à exclure. Des études se sont ainsi portées sur l'éventuelle implication de mécanismes cellulaires qui pourraient, en particulier, être modifiés au cours du vieillissement, le facteur de risque majeur de la MA.

Parmi ces mécanismes, on peut noter que l'influence de l'oxydation sur l'agrégation de Tau a été étudiée. En effet, il est connu qu'une dysfonction mitochondriale est retrouvée au cours du vieillissement (pour revue (Lee and Wei, 2007) et également de façon précoce au

cours la MA (Nunomura *et al.*, 2001). Cette dysfonction mitochondriale conduit alors à la formation des ROS pour « *reactive oxygen species* » qui peuvent, entre autres, entraîner la formation de dérivés lipidiques tels que le HNE pour 4-hydroxy-2-nonéanal. La production de ces dérivés *in cellulo* semble alors intervenir de concert avec la phosphorylation dans les changements de conformation de Tau (Liu *et al.*, 2005b) et sa fibrillogénèse (Perez *et al.*, 2000a; Perez *et al.*, 2002). A côté de ces données, il est également possible d'émettre l'hypothèse que des systèmes cellulaires de compensation, tels que les systèmes de dégradation pourraient empêcher l'apparition des formes agrégées de Tau en favorisant leur dégradation. La diminution reconnue de l'activité de ces systèmes au cours du vieillissement pourrait alors concourir à l'accumulation de protéines Tau anormalement modifiées (pour revues (Martinez-Vicente *et al.*, 2005; Ward, 2002) et à leur fibrillogénèse.

2 Quel est le rôle de la phosphorylation de Tau dans la mort neuronale et quelles sont les formes pathologiques de Tau impliquées ?

La signification physiopathologique des filaments de Tau est encore ouverte à débat et il n'est pas à exclure que des formes anormalement modifiées de Tau mais non-agrégées (formes intermédiaires) pourraient être directement impliquées dans la mort neuronale. En effet, les mécanismes généraux impliqués dans la dégénérescence neuronale, observée au cours de la maladie d'Alzheimer, ainsi que les formes de Tau impliquées dans ce processus ne sont pas encore clairement déterminés. De plus, un certain nombre de travaux de recherche récents suggèrent la révision d'un dogme jusqu'alors admis et basé sur le monopole des formes agrégées de Tau à être impliquées dans la mort neuronale. Cette idée émane du développement de modèles murins basés sur la surexpression inductible de transgènes, et en particulier de protéines Tau mutées, qui semblent apporter de nouveaux éléments quant à la compréhension de l'étiopathologie de la DNF. En effet, grâce à ces modèles, il est désormais possible d'établir plus finement la chronologie des mécanismes impliqués dans cette cascade délétère. De cette façon, Santacruz et collaborateurs ont pu montrer que l'arrêt de la surexpression d'une protéine Tau mutée P301L, après la formation de filaments de Tau (PHFs) menait à une amélioration des performances mnésiques des souris sans qu'il y ait diminution de la quantité de filaments de Tau (Santacruz *et al.*, 2005). De la même façon, dans un modèle murin de co-expression d'une protéine Tau triplement mutée VLW avec la

kinase GSK3- β , et dont la pathologie augmente avec la durée d'induction de l'expression de GSK3- β , Engel et collaborateurs montrent que des déficits cognitifs apparaissent avant même l'apparition de filaments de Tau (Engel *et al.*, 2007). Nos analyses menées dans notre modèle *in vivo* montrent une progression séquentielle de la pathologie Tau avec une phosphorylation de Tau sur certains sites qui pourrait être antérieure à l'agrégation de Tau et à la perte neuronale et les troubles mnésiques plus tardifs. Cependant, la résolution temporelle de notre analyse ne permet pas d'établir clairement la relation de cause à effet entre la formation des agrégats de Tau et la mort neuronale et les troubles mnésiques observés dans notre modèle. De plus, au cours du processus dégénératif, il est envisageable que différentes formes de Tau pathologiques se côtoient (formes intermédiaires et formes agrégées de Tau). Il est donc difficile, dans notre modèle, de définir clairement quelles sont les formes de Tau impliquées directement dans la mort neuronale observée.

Si comme les travaux menés dans les modèles inductibles le suggèrent, « les agrégats de Tau ne sont pas les formes toxiques, quelles sont ces formes ? » (pour revue (Duff and Planel, 2005)). Cette question illustre parfaitement un des défis de la recherche actuelle qui vise à identifier les formes de Tau potentiellement impliquées dans la mort neuronale. Dans ce contexte, on peut émettre l'hypothèse que des formes monomériques de Tau anormalement phosphorylées pourraient constituer des intermédiaires à la dégénérescence neuronale. Ainsi, nous avons pu montrer que la phosphorylation anormale de Tau à la Thr231 était associée à la mort de cellules différenciées de type neuronal et que cette mort cellulaire était également précédée d'une réexpression de marqueurs du cycle cellulaire (une autre caractéristique observée au cours de la maladie d'Alzheimer). Cependant, à l'heure actuelle, nous ne savons pas, dans ce modèle, quelle est la contribution respective de ces deux composantes (phosphorylation anormale de Tau *versus* réexpression de marqueurs du cycle) dans la mort de ces cellules différenciées. L'inhibition de l'une ou l'autre des composantes, dans notre modèle p25/Cdk5, permettrait de comprendre la part de contribution de ces deux processus et en particulier d'évaluer la part de la phosphorylation anormale de Tau à la Thr231 dans la mort neuronale observée et les éventuels mécanismes impliqués. En effet, même si la dérégulation des marqueurs du cycle semble être associée à la DNF et à de nombreux modèles de mort neuronale, le lien entre cet événement et la DNF n'est pas encore connu et pourrait avoir lieu *in vivo* dans des neurones différents (Andorfer *et al.*, 2003). De plus, nos résultats, obtenus dans un modèle cellulaire, sont également à rapprocher de résultats obtenus dans

d'anciens modèles *in vivo* développés chez *D.melanogaster* et *C.elegans*, basés sur la surexpression de protéines Tau sauvages ou mutées. Ces modèles, jusqu'alors considérés comme décevants en raison de l'absence d'un phénotype agrégatif de Tau, présentent, cependant, une accumulation de protéines Tau anormalement phosphorylées associée à une dégénérescence neuronale (pour revue (Brandt *et al.*, 2005). On pourra noter également que dans un modèle murin de surexpression de GSK-3 β , l'accumulation de protéines Tau hyperphosphorylées à l'état soluble, est responsable de troubles de la mémoire spatiale (Hernandez *et al.*, 2002) appuyant également l'hypothèse que ces formes hyperphosphorylées pourraient être également impliquées dans la dysfonction neuronale. Cependant, des résultats contradictoires obtenus dans des modèles murins où la surexpression de protéines Tau sauvage entraîne également une accumulation de protéines Tau hyperphosphorylées mais sans perte neuronale significative laissent suggérer que tous les sites de phosphorylation n'auraient pas la même importance dans les mécanismes impliqués dans la mort neuronale. Ainsi, un travail récent réalisé chez *D.melanogaster*, montre l'importance de la phosphorylation de Tau sur les sites de phosphorylation de type Ser/Thr-Pro au regard de la neurodégénérescence (Steinhilb *et al.*, 2007). Ces dernières données soulignent également l'intérêt de préciser les mécanismes à l'origine de la dérégulation de la phosphorylation de Tau et particulièrement aux sites de phosphorylation de type Ser/Thr-Pro. Ainsi, nous avons pu montrer l'importance du complexe p25/Cdk5, capable d'induire une phosphorylation de Tau sur le site Ser/Thr-Pro de la Thr231. De plus, nous avons montré que la protéine Pin1, une prolyl cis/trans isomérase dont l'expression est augmentée au cours de la différenciation neuronale, apparaît comme un modulateur important de la régulation de la phosphorylation à la Thr231. En effet, cette isomérase est capable *in cellulo* de faciliter la déphosphorylation spécifique de Tau à la Thr231, probablement en jouant sur la conformation Cis/Trans de ce site et ainsi faciliter l'action de la phosphatase Trans spécifique PP2A sur ce site (Zhou *et al.*, 2000). Le nombre d'arguments croissants montrant une altération de la fonction de Pin1 au cours des Tauopathies, et en particulier de la MA (Sultana *et al.*, 2006) (et pour revue (Butterfield *et al.*, 2006), laisse alors supposer que la dysfonction de cette protéine pourrait concourir à l'accumulation de formes anormalement phosphorylées de Tau. En effet, ces dernières seraient moins bien prises en charge par le couple protéique Pin1/PP2A qui, en conditions normales pourrait jouer un rôle physiologique de compensation/ déphosphorylation. Aussi, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition/invalidation de la protéine Pin1 sur l'accumulation de formes phosphorylées et/ou d'agrégats de Tau et la mort neuronale dans

nos modèles cellulaires et également d'étudier l'implication de Pin1 dans notre modèle animal de DNF.

Cependant, si les formes monomériques de Tau anormalement phosphorylées semblent être impliquées, on ne peut pas exclure que d'autres formes de Tau solubles intermédiaires entre ces formes monomériques et les formes de Tau agrégées puissent également participer à la mort neuronale. En effet, la découverte récente de formes oligomériques, retrouvées dans des fractions solubles de Tau et corrélées très étroitement aux déficits cognitifs observés dans un modèle de DNF inductible, soulève, de nouveau, la complexité des mécanismes et des formes de Tau qui pourraient être mises en jeu dans le processus délétère de la DNF (Berger *et al.*, 2007).

Quoi qu'il en soit, les mécanismes d'action impliquant ces formes pathologiques de Tau dans la mort neuronale et la neurodégénérescence (formes anormalement phosphorylées et/ou formes oligomériques) ne sont pas encore élucidés. Actuellement, l'opinion scientifique globale s'accorde à penser que cette dégénérescence neuronale résulterait à la fois d'une perte de fonction de ces protéines Tau pathologiques mais également d'un gain de fonction toxique. En effet, premièrement, il est aisé d'émettre l'hypothèse que les protéines Tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées ne peuvent plus assurer leur fonction stabilisatrice des microtubules. La perturbation de cette homéostasie de phosphorylation de Tau pourrait alors conduire à une perturbation du transport axonal, elle-même responsable d'une absence de transport correct de facteurs neurotrophiques (BDNF, NGF) nécessaires à la survie neuronale. Cette perturbation de phosphorylation pourrait également provoquer une dysfonction synaptique secondaire au défaut de transport axonal (Roy *et al.*, 2005; Trojanowski *et al.*, 2005). Cette hypothèse est appuyée par le fait que la surexpression d'une protéine Tau mutée dans un modèle murin montre l'existence d'une perte synaptique avant même l'apparition d'agrégats de Tau (Yoshiyama *et al.*, 2007). Cette dysfonction synaptique pourrait également être renforcée par un gain de toxicité des protéines Tau anormalement modifiées qui déstabiliserait le cytosquelette d'actine indispensable à l'intégrité de la structure de la synapse (Blard *et al.*, 2007; Fulga *et al.*, 2007) (et pour revue (Gallo, 2007).

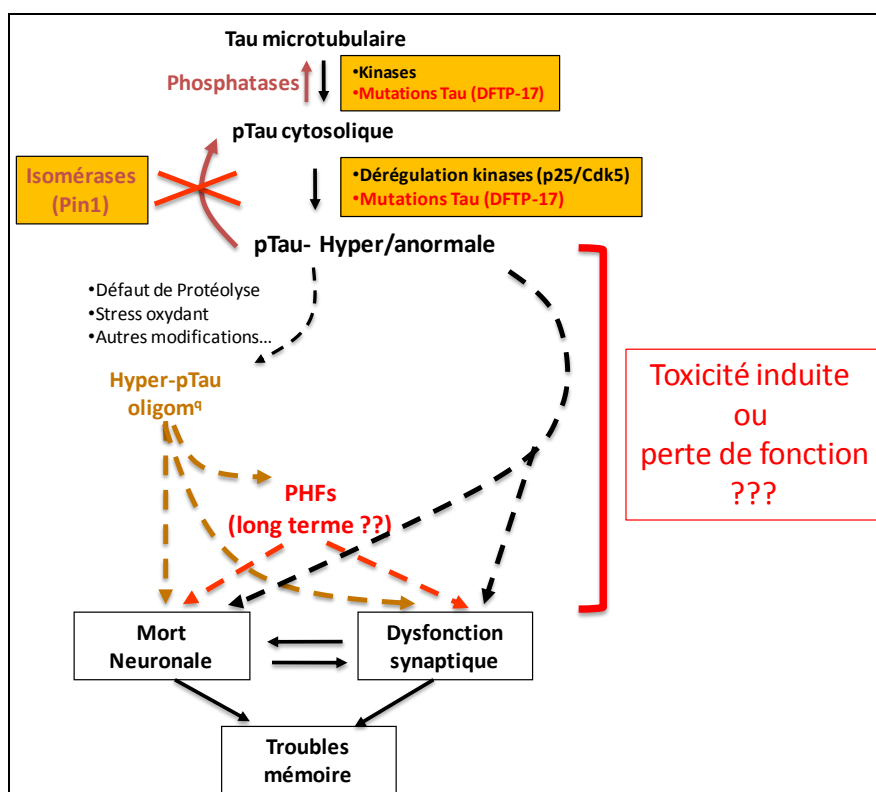


Figure 21 : Schéma de synthèse des hypothèses relatives à la dégénérescence neurofibrillaire : une mort neuronale liée à la dysfonction des protéines Tau.

Dans cette cascade, des événements initiateurs tels que des changements de l'état de phosphorylation des protéines Tau ou des mutations pathologiques pourraient permettre de faire entrer les protéines Tau dans la cascade délétère de la DNF. Cependant d'autres mécanismes semblent nécessaires à la formation des formes agrégées de Tau (PHFs) ou de formes intermédiaires nommées « formes oligomériques ». Actuellement, les formes anormalement modifiées de Tau impliquées dans la mort neuronale restent encore à déterminer mais pourraient agir soit *via* des mécanismes de toxicité induite soit par perte de fonction des protéines Tau anormales. Cette dysfonction des protéines Tau mènerait alors à une dysfonction synaptique et/ou à une mort neuronale co-responsables des troubles cognitifs, un phénotype clinique commun aux Tauopathies.

Enfin, si les agrégats de Tau pourraient être une forme de compensation, dans les stades précoces de la pathologie, afin d'empêcher l'action toxique des formes pathologiques de Tau sous leur formes soluble, il est néanmoins probable que l'encombrement stérique réalisé par ces agrégats de grande taille puisse perturber, à long terme, le fonctionnement cellulaire dans sa globalité et ainsi concourir à une mort neuronale retardée. Enfin, il a été montré récemment dans un modèle cellulaire, basé sur l'expression d'une construction de Tau restreinte aux domaines de répétition, (Khistunova *et al.*, 2006) que les agrégats de ces protéines Tau tronquées étaient également capables de séquestrer des protéines Tau entières (holoprotéine) (Wang *et al.*, 2007b). Cette capacité à piéger des protéines Tau « normales » au sein des agrégats pourrait ainsi accentuer, à long terme, la perte de fonction des protéines Tau et ses conséquences délétères, au sein des neurones.

3 Défaillance de systèmes de compensation/réparation des protéines Tau pathologiques : le lien avec le vieillissement ?

Le deuxième point important apporté par Santacruz et collaborateurs dans l'analyse de leur modèle de DNF inductible, est que la pathologie Tau semble être un processus réversible au moins dans les premiers stades d'évolution de la DNF. Ces résultats soulignent au passage que des systèmes de compensation pourraient prendre en charge les formes de Tau anormalement phosphorylées à l'état soluble et éviter ainsi leurs actions toxiques, au moins au début de la pathologie Tau. Parmi ces systèmes, la protéine Pin1 figurerait parmi les candidats potentiels dans la mise en place de systèmes de compensation en permettant la déphosphorylation de Tau au niveau de sites critiques vis-à-vis de sa fonction et de la pathologie. Cependant, nous émettons également l'hypothèse que les voies de dégradation pourraient aussi contribuer largement à ces systèmes de compensation et expliquer, en partie, l'absence d'une fibrillogénèse établie dans nos modèles cellulaires. La diminution de l'efficacité de ces systèmes au cours du vieillissement, justifierait, *a contrario*, la présence de filaments de Tau dans les modèles murins de DNF. A ce jour, et en raison d'un certain nombre d'évidences génétiques montrant un lien direct entre la défaillance du protéasome et l'agrégation de l' α -synucléine (le constituant des lésions histologiques de la Maladie de Parkinson) dans certaines formes familiales de Maladie de Parkinson (Maraganore *et al.*, 2004; Shimura *et al.*, 1999), l'essentiel des travaux de recherche s'est porté, en première intention, vers l'étude de l'implication du protéasome dans la dégradation des protéines Tau et la DNF. Cette hypothèse est d'autant plus étayée que les protéines Tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées semblent interagir fortement avec un complexe chaperons/co-chaperons mettant en jeu des « *Heat Shock protein* » (Hsp) et la protéine CHIP, un co-chaperon possédant une activité ubiquitine-ligase qui permet la dégradation de ces protéines Tau *via* le protéasome (Dickey *et al.*, 2006a; Hatakeyama *et al.*, 2004; Shimura *et al.*, 2004a; Shimura *et al.*, 2004b). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* puisque l'inactivation d'une protéine CHIP dans un modèle murin conduit à l'accumulation de protéines Tau phosphorylées (Dickey *et al.*, 2006b; Sahara *et al.*, 2005).

Cependant, à ce jour, les données contradictoires concernant l'implication du protéasome dans la dégradation physiologique de la protéine Tau (cf § [1.2.3.2.b, p.25](#)), la méconnaissance

de l'implication d'autres systèmes de dégradation (comme la voie lysosomiale) dans le métabolisme des protéines Tau ainsi que l'implication, de plus en plus suggérée, de systèmes chaperons/co-chaperons dans les maladies neurodégénératives, nous poussent à orienter nos investigations vers l'étude des différents systèmes de dégradation dans nos modèles, et en particulier de la voie lysosomiale.

En effet, un certain nombre d'arguments, suggèrent que cette voie de dégradation, dont l'efficacité diminue au cours du vieillissement (pour revue (Martinez-Vicente *et al.*, 2005), pourrait être impliquée dans les maladies neurodégénératives. Ainsi, *primo*, certains résultats suggèrent qu'une pathologie lysosomiale, jusqu'ici reliée au versant amyloïde de la pathologie, est observée au cours de la MA (Nixon *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005). *Secundo*, une pathologie lysosomiale est également observée dans certains modèles *in vivo* de DNF (Lim *et al.*, 2001) et l'inactivation de gènes impliqués dans l'autophagie est associée à l'accumulation intra-neuronale de matériel protéique et à l'existence d'une neurodégénérescence chez des souris transgéniques (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006a; Komatsu *et al.*, 2006b). D'un point de vue fondamental, on pourra noter que plusieurs voies aboutissent à la dégradation des protéines par les protéases acides des citernes lysosomiales et ont été regroupées sous le terme général d'autophagie. On distinguera ainsi la macroautophagie, impliquée dans la dégradation des organites intracellulaires et la microautophagie responsable de la dégradation d'éléments cytoplasmiques ; ces deux voies constituant les deux formes d'autophagie « non-sélectives ». De façon importante, une troisième voie autophagique appelée CMA pour « *chaperone mediated autophagy* » (Dice, 2007) semble spécifique à la dégradation de protéines cytosoliques à demi-vie longue et comportant un motif consensuel du type « KFERQ-like » : Cette voie de dégradation nécessite l'intervention d'un complexe spécifique de chaperons/co-chaperons comprenant les protéines Hsc70, Hsp40, Hsp90, Hip, Hop et Bag1 et requiert la présence d'un récepteur spécifique à la membrane lysosomiale : lamp2a qui est chargé 1) de fixer le complexe chaperonne-substrat et 2) de transloquer la protéine substrat de la membrane lysosomiale au *lumen* du lysosome (pour revue (Majeski and Dice, 2004) pour sa dégradation par les protéases lysosomiales acides.

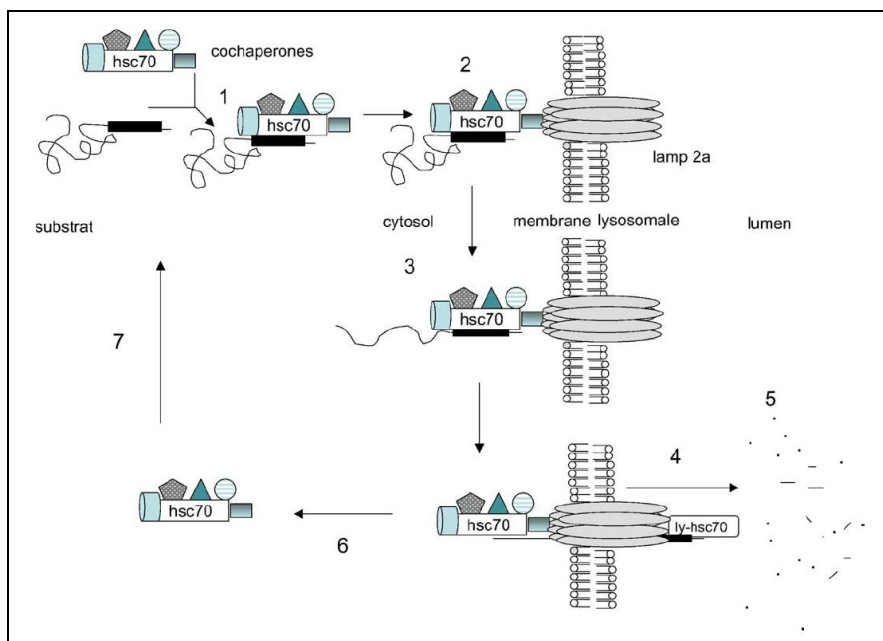


Figure 22: Représentation schématique de l'autophagie médiée par les chaperones. (Majeski and Dice, 2004)

1) La protéine substrat se fixe au complexe de chaperones formé de Hsc70, Hsp 40, Hsp90, Hip, Hop et Bag1. 2) Le complexe chaperone/substrat se fixe au récepteur multimérique Lamp2a situé à la membrane Lyso-somiale. 3) La protéine substrat est déconformée 4) Avec l'aide de la protéine Hsc70 lysosomiale (Ly-Hsc70), le substrat est transloqué de la membrane au lumen pour 5) y être dégradé par les protéases lysosomiales acides. 6) et 7) le complexe de chaperones est libéré et de nouveau libre pour un nouveau cycle de dégradation.

La présence de 1 à 2 motifs putatifs « KFERQ-like » dans la séquence primaire de Tau selon les isoformes (Fig.4), la mise en jeu, dans les maladies neurodégénératives de chaperons moléculaires communs avec la CMA (Dickey *et al.*, 2007) ainsi que la longue demi vie de Tau mise en évidence par certains de nos résultats préliminaires, nous poussent à orienter nos perspectives de recherche vers cette voie de dégradation. De plus, l'efficacité de cette voie de dégradation spécifique, jusqu'ici non-étudiée dans la MA, semble néanmoins altérée dans la dégradation de formes mutées d' α -synucléine qui s'accumulent au sein des corps de Lewy de certaines formes familiales de maladie de Parkinson (Cuervo *et al.*, 2004). Enfin, l'analyse de nos résultats préliminaires obtenus après l'inhibition pharmacologique des protéases lysosomiales acides (par un agent alcalinisant comme le chlorure d'ammonium (NH₄Cl)) montrent une accumulation préférentielle de protéines Tau phosphorylées dans des cellules SY5Y natives ou surexprimant une isoforme de protéine Tau à trois domaines répétés (3R). Ces résultats encourageants nous laissent ainsi supposer que cette voie de dégradation particulière pourrait être impliquée dans la dégradation de Tau. Une analyse plus approfondie, visant à définir les interactions entre les protéines Tau et les différents acteurs impliqués dans cette voie de dégradation et en particulier avec la protéine Lamp2a, nous permettra de

confirmer l'implication de cette voie dans la dégradation des protéines Tau phosphorylées. Enfin, si ces résultats prometteurs se confirment, il serait alors envisageable d'étudier les conséquences d'une dysfonction de cette voie sur l'accumulation des protéines Tau et sur la mort neuronale. La contribution de cette voie de dégradation dans la pathologie Tau observée dans notre modèle animal pourra également être évaluée, ainsi que l'utilisation de la cérébrothèque humaine de notre laboratoire afin de préciser le rôle de cette voie de dégradation lysosomiale dans la DNF et la MA.

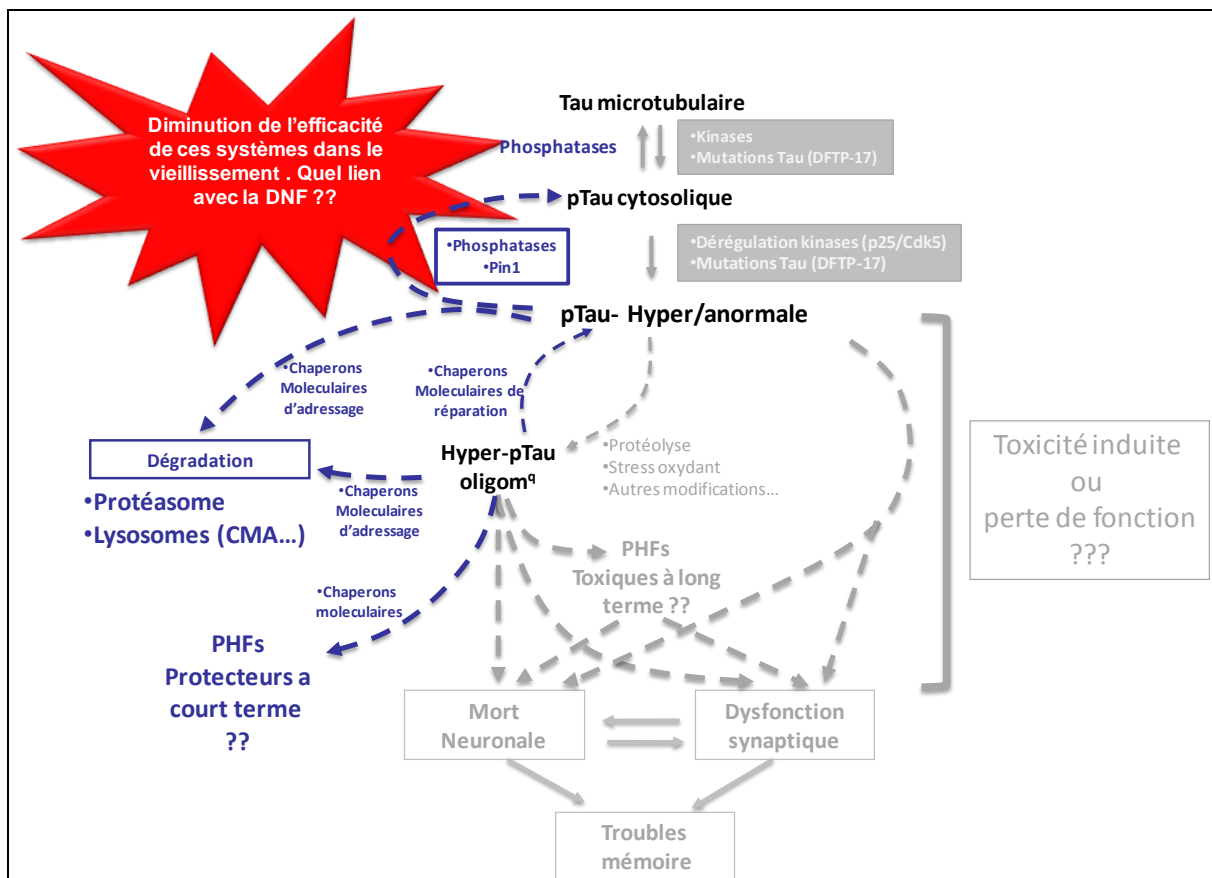


Figure 23 : Systèmes de compensation/réparation capables de prendre en charge les protéines Tau anormales :

Les récentes données obtenues dans des modèles inductibles murins de DNF suggèrent l'existence de systèmes de compensation qui pourrait, au moins dans les premiers stades, prendre en charge les protéines Tau anormalement modifiées. Parmi ces systèmes, le couple enzymatique Pin1/PP2a et les phosphatases pourraient participer par une déphosphorylation des protéines Tau anormalement modifiées. L'implication de systèmes de dégradation et plus généralement de complexes de chaperons/co-chaperons moléculaires permettant à la fois l'adressage vers la dégradation ou la réparation des protéines mal conformées semble également envisageable. Une diminution d'efficacité de ces systèmes, reconnue au cours du vieillissement, pourrait-elle concourir à l'apparition des stigmates de la DNF et faire le lien entre la DNF et le vieillissement cérébral, le facteur de risque majeur de la MA ?

Conclusions

En résumé ce travail a permis le développement de modèles expérimentaux qui reproduisent certains aspects moléculaires observés dans la cascade délétère de la dégénérescence neurofibrillaire : une mort neuronale particulière, liée au dysfonctionnement des protéines Tau. Alors que les résultats des modèles cellulaires suggèrent que la phosphorylation anormale ou les mutations de Tau ne sont pas, à elles seules, suffisantes pour mener à la fibrillogénèse de Tau, les mutations de Tau dans un contexte *in vivo* mènent aux caractéristiques phénotypiques majeures de la DNF à savoir : une dérégulation de la phosphorylation de Tau (Hyperphosphorylation et phosphorylation anormale) et à son agrégation sous la forme de PHFs. L'analyse combinée de ces deux types de modèles suggère ainsi que ces événements moléculaires (dérégulation de phosphorylation et/ou mutations de Tau) pourraient jouer le rôle d'agents facilitateurs. Cependant, il apparaît, d'après nos résultats, que la DNF, pour être complète d'un point de vue phénotypique, ainsi que ses conséquences délétères ne s'exprimeraient que dans un contexte de défaillance de systèmes de compensation/réparation qui pourrait prendre en charge ces protéines Tau anormalement modifiées. Au cours du vieillissement, la diminution de l'efficacité de ces systèmes de compensation pourrait alors concourir à l'expression phénotypique de la DNF.

Ce travail nous oriente, ainsi, vers l'étude de systèmes de compensation tels que les voies de dégradation qui pourraient prendre en charge ces protéines Tau anormalement modifiées dès les premiers stades de la pathologie Tau. L'étude de ces systèmes dans nos modèles constitue ainsi des perspectives, prometteuses dans l'avancée de la compréhension de l'étiopathologie de la MA et des Tauopathies, qui pourraient aboutir à l'identification de nouvelles cibles pertinentes pour le développement d'outils diagnostiques et thérapeutiques dans les Tauopathies.

Bibliographie

Bibliographie

- Ahlijanian, M. K., Barrezueta, N. X., Williams, R. D., Jakowski, A., Kowsz, K. P., McCarthy, S., Coskran, T., Carlo, A., Seymour, P. A., Burkhardt, J. E. *et al.* (2000). Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2910-5.
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M. J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., Emson, P. C. *et al.* (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 22, 9340-51.
- Alonso, A., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6923-8.
- Alonso Adel, C., Mederlyova, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2004). Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations. *J Biol Chem* 279, 34873-81.
- Alvarez, A., Toro, R., Caceres, A. and Maccioni, R. B. (1999). Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* 459, 421-6.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J. R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. and Diaz-Nido, J. (2002). Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord* 4, 153-65.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N. and Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat* 8, 429-31.
- Ando, K., Iijima, K. I., Elliott, J. I., Kirino, Y. and Suzuki, T. (2001). Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid. *J Biol Chem* 276, 40353-61.
- Andorfer, C., Kress, Y., Espinoza, M., de Silva, R., Tucker, K. L., Barde, Y. A., Duff, K. and Davies, P. (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem* 86, 582-90.

- Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739, 91-103.
- Andreadis, A., Broderick, J. A. and Kosik, K. S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23, 3585-93.
- Andreadis, A., Brown, W. M. and Kosik, K. S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626-33.
- Andreadis, A., Nissson, P. E., Kosik, K. S. and Watkins, P. C. (1993). The exon trapping assay partly discriminates against alternatively spliced exons. *Nucleic Acids Res* 21, 2217-21.
- Andreadis, A., Wagner, B. K., Broderick, J. A. and Kosik, K. S. (1996). A tau promoter region without neuronal specificity. *J Neurochem* 66, 2257-63.
- Aplin, A. E., Gibb, G. M., Jacobsen, J. S., Gallo, J. M. and Anderton, B. H. (1996). In vitro phosphorylation of the cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein by glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem* 67, 699-707.
- Arawaka, S., Usami, M., Sahara, N., Schellenberg, G. D., Lee, G. and Mori, H. (1999). The tau mutation (val337met) disrupts cytoskeletal networks of microtubules. *Neuroreport* 10, 993-7.
- Arendash, G. W., Lewis, J., Leighty, R. E., McGowan, E., Cracchiolo, J. R., Hutton, M. and Garcia, M. F. (2004). Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Res* 1012, 29-41.
- Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A. M., Hut, R. A., Rudiger, J., Van der Zee, E. A., Harkany, T., Holzer, M. and 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, 6972-81.
- Arnold, C. S., Johnson, G. V., Cole, R. N., Dong, D. L., Lee, M. and Hart, G. W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271, 28741-4.
- Arriagada, P. V., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T. and Hyman, B. T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 631-9.

- Augustinack, J. C., Schneider, A., Mandelkow, E. M. and Hyman, B. T. (2002). Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 103, 26-35.
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M. and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84, 361-84.
- B**aki, L., Shioi, J., Wen, P., Shao, Z., Schwarzman, A., Gama-Sosa, M., Neve, R. and Robakis, N. K. (2004). PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *Embo J* 23, 2586-96.
- Bellucci, A., Westwood, A. J., Ingram, E., Casamenti, F., Goedert, M. and Spillantini, M. G. (2004). Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein. *Am J Pathol* 165, 1643-52.
- Benneicib, M., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I. and 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.
- Benneicib, M., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I. and 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.
- Berger, Z., Roder, H., Hanna, A., Carlson, A., Rangachari, V., Yue, M., Wszolek, Z., Ashe, K., Knight, J., Dickson, D. *et al.* (2007). Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci* 27, 3650-62.
- Berry, R. W., Abraha, A., Lagalwar, S., LaPointe, N., Gamblin, T. C., Cryns, V. L. and Binder, L. I. (2003). Inhibition of tau polymerization by its carboxy-terminal caspase cleavage fragment. *Biochemistry* 42, 8325-31.
- Bian, F., Nath, R., Sobocinski, G., Booher, R. N., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Pack, A., Wang, K. K. and Walker, L. C. (2002). Axonopathy, tau abnormalities, and dyskinesia, but no neurofibrillary tangles in p25-transgenic mice. *J Comp Neurol* 446, 257-66.
- Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (1993). Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11, 153-63.
- Biernat, J. and Mandelkow, E. M. (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, 727-40.

- Biernat, J., Wu, Y. Z., Timm, T., Zheng-Fischhofer, Q., Mandelkow, E., Meijer, L. and Mandelkow, E. M. (2002). Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell* 13, 4013-28.
- Blard, O., Feuillette, S., Bou, J., Chaumette, B., Frebourg, T., Campion, D. and Lecourtis, M. (2007). Cytoskeleton proteins are modulators of mutant tau-induced neurodegeneration in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 16, 555-566.
- Borghì, R., Giliberto, L., Assini, A., Delacourte, A., Perry, G., Smith, M. A., Strocchi, P., Zaccheo, D. and Tabaton, M. (2002). Increase of cdk5 is related to neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Neurology* 58, 589-92.
- Boyne, L. J., Tessler, A., Murray, M. and Fischer, I. (1995). Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat. *J Comp Neurol* 358, 279-93.
- Braak, H. and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82, 239-59.
- Braak, H. and Del Tredici, K. (2004). Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede insoluble amyloid-beta formation. *Neurobiol Aging* 25, 713-8; discussion 743-6.
- Brandt, R., Hundelt, M. and Shahani, N. (2005). Tau alteration and neuronal degeneration in tauopathies: mechanisms and models. *Biochim Biophys Acta* 1739, 331-54.
- Brandt, R., Leger, J. and Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131, 1327-40.
- Brion, J. P. (1985). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol (Brux)* 95, 229-235.
- Brion, J. P., Smith, C., Couck, A. M., Gallo, J. M. and Anderton, B. H. (1993). Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 61, 2071-80.
- Brion, J. P., Tremp, G. and Octave, J. N. (1999). Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 154, 255-70.
- Brown, M. R., Bondada, V., Keller, J. N., Thorpe, J. and Geddes, J. W. (2005). Proteasome or calpain inhibition does not alter cellular tau levels in neuroblastoma cells or primary neurons. *J Alzheimers Dis* 7, 15-24.

- Brownlees, J., Irving, N. G., Brion, J. P., Gibb, B. J., Wagner, U., Woodgett, J. and Miller, C. C. (1997). Tau phosphorylation in transgenic mice expressing glycogen synthase kinase-3beta transgenes. *Neuroreport* 8, 3251-5.
- Bu, B., Li, J., Davies, P. and Vincent, I. (2002). Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J Neurosci* 22, 6515-25.
- Buee-Scherrer, V., Condamines, O., Mourton-Gilles, C., Jakes, R., Goedert, M., Pau, B. and Delacourte, A. (1996). AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 39, 79-88.
- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. and Hof, P. R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 95-130.
- Bugiani, O., Murrell, J. R., Giaccone, G., Hasegawa, M., Ghigo, G., Tabaton, M., Morbin, M., Primavera, A., Carella, F., Solaro, C. *et al.* (1999). Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 667-77.
- Bunker, J. M., Wilson, L., Jordan, M. A. and Feinstein, S. C. (2004). Modulation of microtubule dynamics by tau in living cells: implications for development and neurodegeneration. *Mol Biol Cell* 15, 2720-8.
- Bussiere, T., Hof, P. R., Mailliot, C., Brown, C. D., Caillet-Boudin, M. L., Perl, D. P., Buee, L. and Delacourte, A. (1999). Phosphorylated serine422 on tau proteins is a pathological epitope found in several diseases with neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathol (Berl)* 97, 221-30.
- Butner, K. A. and Kirschner, M. W. (1991). Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J Cell Biol* 115, 717-30.
- Butterfield, D. A., Abdul, H. M., Opii, W., Newman, S. F., Joshi, G., Ansari, M. A. and Sultana, R. (2006). Pin1 in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 98, 1697-706.
- Caceres, A. and Kosik, K. S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461-3.
- Caillet-Boudin, M. L. and Delacourte, A. (1996). Induction of a specific tau Alzheimer epitope in SY-5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport* 8, 307-10.

- Carmel, G., Mager, E. M., Binder, L. I. and Kuret, J. (1996). The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 271, 32789-95.
- Chen, F., David, D., Ferrari, A. and Gotz, J. (2004). Posttranslational modifications of tau--role in human tauopathies and modeling in transgenic animals. *Curr Drug Targets* 5, 503-15.
- Cho, J. H. and Johnson, G. V. (2003). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* 278, 187-93.
- Cho, J. H. and Johnson, G. V. (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *J Neurochem* 88, 349-58.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1977a). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116, 227-47.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1977b). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116, 207-25.
- Cohen, P. and Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 769-76.
- Condamines, O., Buee-Scherrer, V., Boissier, L., Wattez, A., Delacourte, A., Pau, B. and Mourton-Gilles, C. (1995). New immunoassay for the mapping of neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease using two monoclonal antibodies against human paired helical filament tau proteins. *Neurosci Lett* 192, 81-4.
- Correas, I., Padilla, R. and 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, 61-4.
- Cripps, D., Thomas, S. N., Jeng, Y., Yang, F., Davies, P. and Yang, A. J. (2006). Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 281, 10825-38.
- Cruz, J. C., Kim, D., Moy, L. Y., Dobbin, M. M., Sun, X., Bronson, R. T. and Tsai, L. H. (2006). p25/cyclin-dependent kinase 5 induces production and intraneuronal accumulation of amyloid beta in vivo. *J Neurosci* 26, 10536-41.

- Cruz, J. C. and Tsai, L. H. (2004). Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 10, 452-8.
- Cruz, J. C., Tseng, H. C., Goldman, J. A., Shih, H. and Tsai, L. H. (2003). Aberrant Cdk5 activation by p25 triggers pathological events leading to neurodegeneration and neurofibrillary tangles. *Neuron* 40, 471-83.
- Cuervo, A. M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P. T. and Sulzer, D. (2004). Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 305, 1292-5.
- D**'Souza, I. and Schellenberg, G. D. (2005). Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim Biophys Acta* 1739, 104-15.
- David, D. C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M. and Spillantini, M. G. (2002). Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem* 83, 176-85.
- Dawson, H. N., Ferreira, A., Eyster, M. V., Ghoshal, N., Binder, L. I. and Vitek, M. P. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114, 1179-87.
- Dayanandan, R., Van Slegtenhorst, M., Mack, T. G., Ko, L., Yen, S. H., Leroy, K., Brion, J. P., Anderton, B. H., Hutton, M. and Lovestone, S. (1999). Mutations in tau reduce its microtubule binding properties in intact cells and affect its phosphorylation. *FEBS Lett* 446, 228-32.
- Delacourte, A., David, J. P., Sergeant, N., Buee, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F. *et al.* (1999). The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology* 52, 1158-65.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Champain, D., Wattez, A., Maurage, C. A., Lebert, F., Pasquier, F. and David, J. P. (2002). Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59, 398-407.
- Delobel, P., Flament, S., Hamdane, M., Delacourte, A., Vilain, J. P. and Buee, L. (2002a). Modelling Alzheimer-specific abnormal Tau phosphorylation independently of GSK3beta and PKA kinase activities. *FEBS Lett* 516, 151-5.
- Delobel, P., Flament, S., Hamdane, M., Jakes, R., Rousseau, A., Delacourte, A., Vilain, J. P., Goedert, M. and Buee, L. (2002b). Functional characterization of FTDP-17 tau gene mutations through their effects on *Xenopus* oocyte maturation. *J Biol Chem* 277, 9199-205.

- Delobel, P., Lavenir, I., Ghetti, B., Holzer, M. and Goedert, M. (2006). Cell-cycle markers in a transgenic mouse model of human tauopathy: increased levels of cyclin-dependent kinase inhibitors p21Cip1 and p27Kip1. *Am J Pathol* 168, 878-87.
- Delobel, P., Leroy, O., Hamdane, M., Sambo, A. V., Delacourte, A. and Buee, L. (2005). Proteasome inhibition and Tau proteolysis: an unexpected regulation. *FEBS Lett* 579, 1-5.
- Derkinderen, P., Scales, T. M., Hanger, D. P., Leung, K. Y., Byers, H. L., Ward, M. A., Lenz, C., Price, C., Bird, I. N., Perera, T. *et al.* (2005). Tyrosine 394 is phosphorylated in Alzheimer's paired helical filament tau and in fetal tau with c-Abl as the candidate tyrosine kinase. *J Neurosci* 25, 6584-93.
- DeTure, M., Ko, L. W., Easson, C. and Yen, S. H. (2002a). Tau assembly in inducible transfectants expressing wild-type or FTDP-17 tau. *Am J Pathol* 161, 1711-22.
- DeTure, M., Ko, L. W., Yen, S., Nacharaju, P., Easson, C., Lewis, J., van Slegtenhorst, M., Hutton, M. and Yen, S. H. (2000). Missense tau mutations identified in FTDP-17 have a small effect on tau-microtubule interactions. *Brain Res* 853, 5-14.
- DeTure, M. A., Di Noto, L. and Purich, D. L. (2002b). In vitro assembly of Alzheimer-like filaments. How a small cluster of charged residues in Tau and MAP2 controls filament morphology. *J Biol Chem* 277, 34755-9.
- Dhavan, R. and Tsai, L. H. (2001). A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 749-59.
- Dice, J. F. (2007). Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295-9.
- Dickey, C. A., Dunmore, J., Lu, B., Wang, J. W., Lee, W. C., Kamal, A., Burrows, F., Eckman, C., Hutton, M. and Petrucelli, L. (2006a). HSP induction mediates selective clearance of tau phosphorylated at proline-directed Ser/Thr sites but not KXGS (MARK) sites. *Faseb J* 20, 753-5.
- Dickey, C. A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R. M., Dunmore, J., Ash, P., Shoraka, S., Zlatkovic, J., Eckman, C. B. *et al.* (2007). The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins. *J Clin Invest* 117, 648-58.
- Dickey, C. A., Yue, M., Lin, W. L., Dickson, D. W., Dunmore, J. H., Lee, W. C., Zehr, C., West, G., Cao, S., Clark, A. M. *et al.* (2006b). Deletion of the ubiquitin ligase CHIP leads to the accumulation, but not the aggregation, of both endogenous phospho- and caspase-3-cleaved tau species. *J Neurosci* 26, 6985-96.
- Dohmen, R. J. (2004). SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* 1695, 113-31.

- Dorval, V. and Fraser, P. E. (2006). Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 281, 9919-24.
- Dranovsky, A., Vincent, I., Gregori, L., Schwarzman, A., Colflesh, D., Enghild, J., Strittmatter, W., Davies, P. and Goldgaber, D. (2001). Cdc2 phosphorylation of nucleolin demarcates mitotic stages and Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging* 22, 517-28.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M. and 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, 7679-88.
- Drubin, D. G., Feinstein, S. C., Shooter, E. M. and Kirschner, M. W. (1985). Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol* 101, 1799-807.
- Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C. M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D. *et al.* (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383, 710-3.
- Duff, K., Knight, H., Refolo, L. M., Sanders, S., Yu, X., Picciano, M., Malester, B., Hutton, M., Adamson, J., Goedert, M. *et al.* (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* 7, 87-98.
- Duff, K. and Planel, E. (2005). Untangling memory deficits. *Nat Med* 11, 826-7.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. and 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, 777-94.
- Egashira, N., Iwasaki, K., Takashima, A., Watanabe, T., Kawabe, H., Matsuda, T., Mishima, K., Chidori, S., Nishimura, R. and Fujiwara, M. (2005). Altered depression-related behavior and neurochemical changes in serotonergic neurons in mutant R406W human tau transgenic mice. *Brain Res* 1059, 7-12.
- Ekinci, F. J. and Shea, T. B. (2000). Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol* 20, 497-508.
- Elliott, E., Atlas, R., Lange, A. and Ginzburg, I. (2005). Brain-derived neurotrophic factor induces a rapid dephosphorylation of tau protein through a PI-3 Kinase signalling mechanism. *Eur J Neurosci* 22, 1081-9.

- Engel, T., Goni-Oliver, P., Lucas, J. J., Avila, J. and Hernandez, F. (2006a). Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3beta overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem*.
- Engel, T., Hernandez, F., Avila, J. and Lucas, J. J. (2006b). Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26, 5083-90.
- Engel, T., Lucas, J. J., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Avila, J. and Hernandez, F. (2006c). Coexpression of FTDP-17 tau and GSK-3beta in transgenic mice induce tau polymerization and neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 27, 1258-68.
- Engel, T., Lucas, J. J., Hernandez, F. and Avila, J. (2007). A mouse model to study tau pathology related with tau phosphorylation and assembly. *J Neurol Sci*.
- Esmaeli-Azad, B., McCarty, J. H. and Feinstein, S. C. (1994). Sense and antisense transfection analysis of tau function: tau influences net microtubule assembly, neurite outgrowth and neuritic stability. *J Cell Sci* 107 (Pt 4), 869-79.
- Esposito, G., Viglino, P., Novak, M. and Cattaneo, A. (2000). The solution structure of the C-terminal segment of tau protein. *J Pept Sci* 6, 550-9.
- Fahnestock, M., Garzon, D., Holsinger, R. M. and Michalski, B. (2002). Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl*, 241-52.
- Farah, C. A., Perreault, S., Liazoghli, D., Desjardins, M., Anton, A., Lauzon, M., Paiement, J. and Leclerc, N. (2006). Tau interacts with Golgi membranes and mediates their association with microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 710-24.
- Ferrari, A., Hoerndli, F., Baechi, T., Nitsch, R. M. and Gotz, J. (2003). beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem* 278, 40162-8.
- Ferrer, I., Gomez-Isla, T., Puig, B., Freixes, M., Ribe, E., Dalfo, E. and Avila, J. (2005). Current advances on different kinases involved in tau phosphorylation, and implications in Alzheimer's disease and tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2, 3-18.
- Feuillette, S., Blard, O., Lecourtois, M., Frebourg, T., Campion, D. and Dumanchin, C. (2005). Tau is not normally degraded by the proteasome. *J Neurosci Res* 80, 400-5.
- Flament, S. and Delacourte, A. (1989). Abnormal tau species are produced during Alzheimer's disease neurodegenerating process. *FEBS Lett* 247, 213-6.

- Flament, S., Delacourte, A., Hemon, B. and Defossez, A. (1989). [Direct demonstration of abnormal phosphorylation of Tau microtubular proteins in Alzheimer's disease]. *C R Acad Sci III* 308, 77-82.
- Frame, S., Cohen, P. and Biondi, R. M. (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* 7, 1321-7.
- Fulga, T. A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M. L., Spires, T. L., Hyman, B. T. and Feany, M. B. (2007). Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9, 139-48.
- Gallo, G. (2007). Tau is actin up in Alzheimer's disease. *Nat Cell Biol* 9, 133-4.
- Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N. *et al.* (2003). Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10032-7.
- Gamblin, T. C., King, M. E., Dawson, H., Vitek, M. P., Kuret, J., Berry, R. W. and Binder, L. I. (2000). In vitro polymerization of tau protein monitored by laser light scattering: method and application to the study of FTDP-17 mutants. *Biochemistry* 39, 6136-44.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., Gillespie, F. *et al.* (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373, 523-7.
- Georgieff, I. S., Liem, R. K., Couchie, D., Mavilia, C., Nunez, J. and Shelanski, M. L. (1993). Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* 105 (Pt 3), 729-37.
- Ghoshal, N., Garcia-Sierra, F., Wu, J., Leurgans, S., Bennett, D. A., Berry, R. W. and Binder, L. I. (2002). Tau conformational changes correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 177, 475-93.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984a). Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122, 1131-5.
- Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984b). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 885-90.

- Goedert, M. and Jakes, R. (1990). Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* 9, 4225-30.
- Goedert, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Cohen, P., Vanmechelen, E., Vandermeeren, M. and Cras, P. (1994). Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J* 301 (Pt 3), 871-7.
- Goedert, M., Jakes, R., Qi, Z., Wang, J. H. and 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, 2804-7.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J. and Crowther, R. A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159-68.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J. and Crowther, R. A. (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 8, 393-9.
- Goldbaum, O., Oppermann, M., Handschuh, M., Dabir, D., Zhang, B., Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. and Richter-Landsberg, C. (2003). Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid. *J Neurosci* 23, 8872-80.
- Gong, C. X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 112, 813-38.
- Gong, C. X., Liu, F., Wu, G., Rossie, S., Wegiel, J., Li, L., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2004). Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase 5. *J Neurochem* 88, 298-310.
- Gong, C. X., Singh, T. J., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1993). Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 61, 921-7.
- Goode, B. L., Chau, M., Denis, P. E. and Feinstein, S. C. (2000). Structural and functional differences between 3-repeat and 4-repeat tau isoforms. Implications for normal tau function and the onset of neurodegenerative disease. *J Biol Chem* 275, 38182-9.

- Goode, B. L., Denis, P. E., Panda, D., Radeke, M. J., Miller, H. P., Wilson, L. and Feinstein, S. C. (1997). Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* 8, 353-65.
- Goode, B. L. and Feinstein, S. C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124, 769-82.
- Gotz, J., Chen, F., Barmettler, R. and Nitsch, R. M. (2001a). Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* 276, 529-34.
- Gotz, J., Chen, F., van Dorpe, J. and Nitsch, R. M. (2001b). Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* 293, 1491-5.
- Gotz, J., Probst, A., Spillantini, M. G., Schafer, T., Jakes, R., Burki, K. and Goedert, M. (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *Embo J* 14, 1304-13.
- Gotz, J., Tolnay, M., Barmettler, R., Chen, F., Probst, A. and Nitsch, R. M. (2001c). Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur J Neurosci* 13, 2131-40.
- Greenberg, S. G., Davies, P., Schein, J. D. and Binder, L. I. (1992). Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau. *J Biol Chem* 267, 564-9.
- Grimes, C. A. and Jope, R. S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* 65, 391-426.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y. C., Zaidi, M. S. and Wisniewski, H. M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-9.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y. C., Quinlan, M., Wisniewski, H. M. and Binder, L. I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-7.
- Haase, C., Stieler, J. T., Arendt, T. and Holzer, M. (2004). Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem* 88, 1509-20.
- Hall, G. F. and Yao, J. (2005). Modeling tauopathy: a range of complementary approaches. *Biochim Biophys Acta* 1739, 224-39.
- Hamdane, M., Delobel, P., Sambo, A. V., Smet, C., Begard, S., Violleau, A., Landrieu, I., Delacourte, A., Lippens, G., Flament, S. *et al.* (2003a). Neurofibrillary degeneration of the

- Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? *Biochem Pharmacol* 66, 1619-25.
- Hamdane, M., Sambo, A. V., Delobel, P., Begard, S., Violleau, A., Delacourte, A., Bertrand, P., Benavides, J. and Buee, L. (2003b). Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J Biol Chem* 278, 34026-34.
- Hamdane, M., Smet, C., Sambo, A. V., Leroy, A., Wieruszeski, J. M., Delobel, P., Maurage, C. A., Ghestem, A., Wintjens, R., Begard, S. *et al.* (2002). Pin1: a therapeutic target in Alzheimer neurodegeneration. *J Mol Neurosci* 19, 275-87.
- Hanger, D. P., Betts, J. C., Loviny, T. L., Blackstock, W. P. and Anderton, B. H. (1998). New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry. *J Neurochem* 71, 2465-76.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H. *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-9.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353-6.
- Hardy, J. A. and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184-5.
- Hart, G. W., Kreppel, L. K., Comer, F. I., Arnold, C. S., Snow, D. M., Ye, Z., Cheng, X., DellaManna, D., Caine, D. S., Earles, B. J. *et al.* (1996). O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology* 6, 711-6.
- Hartig, W., Oklejewicz, M., Strijkstra, A. M., Boerema, A. S., Stieler, J. and Arendt, T. (2005). Phosphorylation of the tau protein sequence 199-205 in the hippocampal CA3 region of Syrian hamsters in adulthood and during aging. *Brain Res* 1056, 100-4.
- Hartig, W., Stieler, J., Boerema, A. S., Wolf, J., Schmidt, U., Weissfuss, J., Bullmann, T., Strijkstra, A. M. and Arendt, T. (2007). Hibernation model of tau phosphorylation in hamsters: selective vulnerability of cholinergic basal forebrain neurons - implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 25, 69-80.
- Hasegawa, M., Jakes, R., Crowther, R. A., Lee, V. M., Ihara, Y. and Goedert, M. (1996). Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* 384, 25-30.

- Hasegawa, M., Smith, M. J. and Goedert, M. (1998). Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 437, 207-10.
- Hasegawa, M., Smith, M. J., Iijima, M., Tabira, T. and Goedert, M. (1999). FTDP-17 mutations N279K and S305N in tau produce increased splicing of exon 10. *FEBS Lett* 443, 93-6.
- Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Kamura, T., Murayama, M., Chui, D. H., Planel, E., Takahashi, R., Nakayama, K. I. and Takashima, A. (2004). U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J Neurochem* 91, 299-307.
- Hernandez, F., Borrell, J., Guaza, C., Avila, J. and Lucas, J. J. (2002). Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3beta in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem* 83, 1529-33.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M. W. and Martin, D. W., Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9, 1381-8.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y. and Okabe, S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107, 1449-59.
- Hirrlinger, P. G., Scheller, A., Braun, C., Quintela-Schneider, M., Fuss, B., Hirrlinger, J. and Kirchhoff, F. (2005). Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 30, 291-303.
- Ho, L., Xiang, Z., Mukherjee, P., Zhang, W., De Jesus, N., Mirjany, M., Yemul, S. and Pasinetti, G. M. (2001). Gene expression profiling of the tau mutant (P301L) transgenic mouse brain. *Neurosci Lett* 310, 1-4.
- Hoffmann, R., Lee, V. M., Leight, S., Varga, I. and Otvos, L., Jr. (1997). Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 36, 8114-24.
- Hong, M., Chen, D. C., Klein, P. S. and Lee, V. M. (1997). Lithium reduces tau phosphorylation by inhibition of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 272, 25326-32.
- Hong, M., Zhukareva, V., Vogelsberg-Ragaglia, V., Wszolek, Z., Reed, L., Miller, B. I., Geschwind, D. H., Bird, T. D., McKeel, D., Goate, A. *et al.* (1998). Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17. *Science* 282, 1914-7.

- Hutton, M., Lendon, C. L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A. *et al.* (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-5.
- Hwang, S. C., Jhon, D. Y., Bae, Y. S., Kim, J. H. and Rhee, S. G. (1996). Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 271, 18342-9.
- Ikedo, M., Shoji, M., Kawarai, T., Kawarabayashi, T., Matsubara, E., Murakami, T., Sasaki, A., Tomidokoro, Y., Ikarashi, Y., Kuribara, H. *et al.* (2005). Accumulation of filamentous tau in the cerebral cortex of human tau R406W transgenic mice. *Am J Pathol* 166, 521-31.
- Iliev, A. I., Ganesan, S., Bunt, G. and Wouters, F. S. (2006). Removal of Pattern-breaking Sequences in Microtubule Binding Repeats Produces Instantaneous Tau Aggregation and Toxicity. *J Biol Chem* 281, 37195-204.
- Ishiguro, K., Shiratsuchi, A., Sato, S., Omori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T. and Imahori, K. (1993). Glycogen synthase kinase 3 beta is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett* 325, 167-72.
- Ishihara, T., Hong, M., Zhang, B., Nakagawa, Y., Lee, M. K., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (1999). Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 24, 751-62.
- Ishihara, T., Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2001). Age-dependent induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *Am J Pathol* 158, 555-62.
- Jancsik, V., Filliol, D., Felter, S. and Rendon, A. (1989). Binding of microtubule-associated proteins (MAPs) to rat brain mitochondria: a comparative study of the binding of MAP2, its microtubule-binding and projection domains, and tau proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 14, 372-81.
- Jenkins, S. M. and Johnson, G. V. (1998). Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 9, 67-71.
- Jicha, G. A., Bowser, R., Kazam, I. G. and 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, 128-32.
- Jicha, G. A., Lane, E., Vincent, I., Otvos, L., Jr., Hoffmann, R. and Davies, P. (1997b). A conformation- and phosphorylation-dependent antibody recognizing the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 69, 2087-95.

- Johnson, G. V. and Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci* 117, 5721-9.
- Jung, D., Filliol, D., Mieke, M. and Rendon, A. (1993). Interaction of brain mitochondria with microtubules reconstituted from brain tubulin and MAP2 or TAU. *Cell Motil Cytoskeleton* 24, 245-55.
- Junn, E., Lee, S. S., Suhr, U. T. and Mouradian, M. M. (2002). Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment. *J Biol Chem* 277, 47870-7.
- Junn, E., Ronchetti, R. D., Quezado, M. M., Kim, S. Y. and Mouradian, M. M. (2003). Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2047-52.
- Kalback, W., Watson, M. D., Kokjohn, T. A., Kuo, Y. M., Weiss, N., Luehrs, D. C., Lopez, J., Brune, D., Sisodia, S. S., Staufenbiel, M. *et al.* (2002). APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques. *Biochemistry* 41, 922-8.
- Kampers, T., Pangalos, M., Geerts, H., Wiech, H. and Mandelkow, E. (1999). Assembly of paired helical filaments from mouse tau: implications for the neurofibrillary pathology in transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 451, 39-44.
- Kannanayakal, T. J., Tao, H., Vandre, D. D. and Kuret, J. (2006). Casein kinase-1 isoforms differentially associate with neurofibrillary and granulovacuolar degeneration lesions. *Acta Neuropathol (Berl)* 111, 413-21.
- Khlistunova, I., Biernat, J., Wang, Y., Pickhardt, M., von Bergen, M., Gazova, Z., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (2006). Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem* 281, 1205-14.
- Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature* 197, 192-3.
- Kim, L., Liu, J. and Kimmel, A. R. (1999). The novel tyrosine kinase ZAK1 activates GSK3 to direct cell fate specification. *Cell* 99, 399-408.
- Kins, S., Cramer, A., Evans, D. R., Hemmings, B. A., Nitsch, R. M. and Gotz, J. (2001). Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 276, 38193-200.

- Kins, S., Kurosinski, P., Nitsch, R. M. and Gotz, J. (2003). Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am J Pathol* 163, 833-43.
- Klein, C., Kramer, E. M., Cardine, A. M., Schraven, B., Brandt, R. and Trotter, J. (2002). Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *J Neurosci* 22, 698-707.
- Ko, L. W., DeTure, M., Sahara, N., Chihab, R., Vega, I. E. and Yen, S. H. (2005). Recent advances in experimental modeling of the assembly of tau filaments. *Biochim Biophys Acta* 1739, 125-39.
- Ko, L. W., Kulathingal, J. G. and Yen, S. H. (2007). Cytosine beta-D-arabinofuranoside used as a Paradigm Modifier to Increase Production of Tau Aggregates in a Cellular Model of Tauopathy. *Neurochem Res* 32, 823-32.
- Kobayashi, S., Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Arioka, M., Imahori, K. and Uchida, T. (1993). A cdc2-related kinase PSSALRE/cdk5 is homologous with the 30 kDa subunit of tau protein kinase II, a proline-directed protein kinase associated with microtubule. *FEBS Lett* 335, 171-5.
- Komatsu, M., Kominami, E. and Tanaka, K. (2006a). Autophagy and neurodegeneration. *Autophagy* 2, 315-7.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E. *et al.* (2006b). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-4.
- Kopke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 268, 24374-84.
- Kraemer, B. C., Zhang, B., Leverenz, J. B., Thomas, J. H., Trojanowski, J. Q. and Schellenberg, G. D. (2003). Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9980-5.
- Ksiezak-Reding, H., Liu, W. K. and Yen, S. H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res* 597, 209-19.
- Kumar-Singh, S. and Van Broeckhoven, C. (2007). Frontotemporal lobar degeneration: current concepts in the light of recent advances. *Brain Pathol* 17, 104-14.

- Lambert, J. C., Bensemain, F., Chapuis, J., Cotel, D. and Amouyel, P. (2006). Association study of the PIN1 gene with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 402, 259-61.
- Lee, G. (2005). Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta* 1739, 323-30.
- Lee, G., Newman, S. T., Gard, D. L., Band, H. and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3167-77.
- Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K., Fang, S. M., Do, L. H., Andreadis, A., Van Hoesen, G. and Ksiezak-Reding, H. (2004). Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 2304-12.
- Lee, H.-C. and Wei, Y.-H. (2007). Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Apoptosis in Aging. *Experimental Biology and Medicine* 232, 592-606.
- Lee, H. J., Shin, S. Y., Choi, C., Lee, Y. H. and Lee, S. J. (2002). Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *J Biol Chem* 277, 5411-7.
- Lee, K. Y., Clark, A. W., Rosales, J. L., Chapman, K., Fung, T. and Johnston, R. N. (1999). Elevated neuronal Cdc2-like kinase activity in the Alzheimer disease brain. *Neurosci Res* 34, 21-9.
- Lee, M. S., Kao, S. C., Lemere, C. A., Xia, W., Tseng, H. C., Zhou, Y., Neve, R., Ahlijanian, M. K. and Tsai, L. H. (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J Cell Biol* 163, 83-95.
- Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M. and Tsai, L. H. (2000). Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain. *Nature* 405, 360-4.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M. J., Delacourte, A., Michalski, J. C. and Caillet-Boudin, M. L. (2003). Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1619, 167-76.
- Leroy, K., Yilmaz, Z. and Brion, J. P. (2007). Increased level of active GSK-3beta in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurones at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 43-55.
- Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D. *et al.* (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293, 1487-91.

- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., Gwinn-Hardy, K., Paul Murphy, M., Baker, M., Yu, X. *et al.* (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 25, 402-5.
- Li, T., Hawkes, C., Qureshi, H. Y., Kar, S. and Paudel, H. K. (2006a). Cyclin-dependent protein kinase 5 primes microtubule-associated protein tau site-specifically for glycogen synthase kinase 3beta. *Biochemistry* 45, 3134-45.
- Li, T. and Paudel, H. K. (2006). Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates Alzheimer's disease-specific Ser396 of microtubule-associated protein tau by a sequential mechanism. *Biochemistry* 45, 3125-33.
- Li, X., Lu, F., Wang, J. Z. and Gong, C. X. (2006b). Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting, vol. 23, pp. 2078-86.
- Lim, F., Hernandez, F., Lucas, J. J., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A. and Avila, J. (2001). FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* 18, 702-14.
- Lindwall, G. and Cole, R. D. (1984a). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259, 5301-5.
- Lindwall, G. and Cole, R. D. (1984b). The purification of tau protein and the occurrence of two phosphorylation states of tau in brain. *J Biol Chem* 259, 12241-5.
- Liou, Y. C., Sun, A., Ryo, A., Zhou, X. Z., Yu, Z. X., Huang, H. K., Uchida, T., Bronson, R., Bing, G., Li, X. *et al.* (2003). Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* 424, 556-61.
- Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Gong, C. X. (2005a). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci* 22, 1942-50.
- Liu, F., Liang, Z., Shi, J., Yin, D., El-Akkad, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Gong, C. X. (2006). PKA modulates GSK-3beta- and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners. *FEBS Lett* 580, 6269-6274.
- Liu, Q., Smith, M. A., Avila, J., DeBernardis, J., Kansal, M., Takeda, A., Zhu, X., Nunomura, A., Honda, K., Moreira, P. I. *et al.* (2005b). Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med* 38, 746-54.

- Lu, K. P., Hanes, S. D. and Hunter, T. (1996). A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. *Nature* 380, 544-7.
- Lu, M. and Kosik, K. S. (2001). Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell* 12, 171-84.
- Lu, P. J., Wulf, G., Zhou, X. Z., Davies, P. and Lu, K. P. (1999). The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399, 784-8.
- Lucas, J. J., Hernandez, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M. A., Hen, R. and Avila, J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *Embo J* 20, 27-39.
- Luo, M. H., Tse, S. W., Memmott, J. and Andreadis, A. (2004). Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *J Neurochem* 90, 340-51.
- M**aas, T., Eidenmuller, J. and 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, 15733-40.
- Mack, T. G., Dayanandan, R., Van Slegtenhorst, M., Whone, A., Hutton, M., Lovestone, S. and Anderton, B. H. (2001). Tau proteins with frontotemporal dementia-17 mutations have both altered expression levels and phosphorylation profiles in differentiated neuroblastoma cells. *Neuroscience* 108, 701-12.
- Mailliot, C., Bussiere, T., Caillet-Boudin, M. L., Delacourte, A. and 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, 13-6.
- Majeski, A. E. and Dice, J. F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2435-44.
- Mandelkow, E. M., Thies, E., Trinczek, B., Biernat, J. and Mandelkow, E. (2004). MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol* 167, 99-110.
- Mandell, J. W. and Banker, G. A. (1996). A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 16, 5727-40.
- Maraganore, D. M., Lesnick, T. G., Elbaz, A., Chartier-Harlin, M. C., Gasser, T., Kruger, R., Hattori, N., Mellick, G. D., Quattrone, A., Satoh, J. *et al.* (2004). UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Ann Neurol* 55, 512-21.

- Martinez-Vicente, M., Sovak, G. and Cuervo, A. M. (2005). Protein degradation and aging. *Exp Gerontol* 40, 622-33.
- Matsumura, N., Yamazaki, T. and Ihara, Y. (1999). Stable expression in Chinese hamster ovary cells of mutated tau genes causing frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Am J Pathol* 154, 1649-56.
- McGowan, E., Eriksen, J. and Hutton, M. (2006). A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet* 22, 281-9.
- McShea, A., Harris, P. L., Webster, K. R., Wahl, A. F. and Smith, M. A. (1997). Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 150, 1933-9.
- Mercken, M., Vandermeeren, M., Lubke, U., Six, J., Boons, J., Van de Voorde, A., Martin, J. J. and Gheuens, J. (1992). Monoclonal antibodies with selective specificity for Alzheimer Tau are directed against phosphatase-sensitive epitopes. *Acta Neuropathol (Berl)* 84, 265-72.
- Moraga, D. M., Nunez, P., Garrido, J. and Maccioni, R. B. (1993). A tau fragment containing a repetitive sequence induces bundling of actin filaments. *J Neurochem* 61, 979-86.
- Mori, H., Kondo, J. and Ihara, Y. (1987). Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* 235, 1641-4.
- Morioka, M., Kawano, T., Yano, S., Kai, Y., Tsuiki, H., Yoshinaga, Y., Matsumoto, J., Maeda, T., Hamada, J., Yamamoto, H. *et al.* (2006). Hyperphosphorylation at serine 199/202 of tau factor in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 273-8.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Titani, K. and Ihara, Y. (1993). Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments. *Neuron* 10, 1151-60.
- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Watanabe, A., Titani, K. and Ihara, Y. (1995). Hyperphosphorylation of tau in PHF. *Neurobiol Aging* 16, 365-71; discussion 371-80.
- Mudher, A., Shepherd, D., Newman, T. A., Mildren, P., Jukes, J. P., Squire, A., Mears, A., Drummond, J. A., Berg, S., MacKay, D. *et al.* (2004). GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in Drosophila. *Mol Psychiatry* 9, 522-30.

- Munoz-Montano, J. R., Moreno, F. J., Avila, J. and Diaz-Nido, J. (1997). Lithium inhibits Alzheimer's disease-like tau protein phosphorylation in neurons. *FEBS Lett* 411, 183-8.
- Murakami, T., Paitel, E., Kawarabayashi, T., Ikeda, M., Chishti, M. A., Janus, C., Matsubara, E., Sasaki, A., Kawarai, T., Phinney, A. L. *et al.* (2006). Cortical neuronal and glial pathology in TgTauP301L transgenic mice: neuronal degeneration, memory disturbance, and phenotypic variation. *Am J Pathol* 169, 1365-75.
- Nacharaju, P., Lewis, J., Easson, C., Yen, S., Hackett, J., Hutton, M. and Yen, S. H. (1999). Accelerated filament formation from tau protein with specific FTDP-17 missense mutations. *FEBS Lett* 447, 195-9.
- Nagiec, E. W., Sampson, K. E. and Abraham, I. (2001). Mutated tau binds less avidly to microtubules than wildtype tau in living cells. *J Neurosci Res* 63, 268-75.
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M. and Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387, 271-80.
- Nixon, R. A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W. H., Peterhoff, C., Cataldo, A. and Cuervo, A. M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 113-22.
- Noble, W., Olm, V., Takata, K., Casey, E., Mary, O., Meyerson, J., Gaynor, K., LaFrancois, J., Wang, L., Kondo, T. *et al.* (2003). Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron* 38, 555-65.
- Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B. *et al.* (2005). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6990-5.
- Nowotny, P., Bertelsen, S., Hinrichs, A. L., Kauwe, J. S., Mayo, K., Jacquart, S., Morris, J. C. and Goate, A. (2007). Association studies between common variants in prolyl isomerase Pin1 and the risk for late-onset Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 419, 15-7.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S. *et al.* (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 759-67.
- Ott, C., Concha, II, Arendt, T., Stieler, J., Schliebs, R., Gonzalez-Billault, C. and Maccioni, R. B. (2002). AbetaPP induces cdk5-dependent tau hyperphosphorylation in

- transgenic mice Tg2576. *J Alzheimers Dis* 4, 417-30.
- Otvos, L., Jr., Feiner, L., Lang, E., Szendrei, G. I., Goedert, M. and Lee, V. M. (1994). Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 39, 669-73.
- Panda, D., Samuel, J. C., Massie, M., Feinstein, S. C. and Wilson, L. (2003). Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9548-53.
- Patrick, G. N., Zhou, P., Kwon, Y. T., Howley, P. M. and Tsai, L. H. (1998). p35, the neuronal-specific activator of cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 273, 24057-64.
- Patrick, G. N., Zukerberg, L., Nikolic, M., de la Monte, S., Dikkes, P. and Tsai, L. H. (1999). Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. *Nature* 402, 615-22.
- Pei, J. J., Braak, E., Braak, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Winblad, B. and Cowburn, R. F. (1999). Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 1010-9.
- Pei, J. J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Bogdanovic, N., Winblad, B. and Cowburn, R. F. (1998). Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res* 797, 267-77.
- Pennanen, L., Wolfer, D. P., Nitsch, R. M. and Gotz, J. (2006). Impaired spatial reference memory and increased exploratory behavior in P301L tau transgenic mice. *Genes Brain Behav* 5, 369-79.
- Perez, M., Cuadros, R., Smith, M. A., Perry, G. and Avila, J. (2000a). Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett* 486, 270-4.
- Perez, M., Hernandez, F., Gomez-Ramos, A., Smith, M., Perry, G. and Avila, J. (2002). Formation of aberrant phosphotau fibrillar polymers in neural cultured cells. *Eur J Biochem* 269, 1484-9.
- Perez, M., Hernandez, F., Lim, F., Diaz-Nido, J. and Avila, J. (2003). Chronic lithium treatment decreases mutant tau protein aggregation in a transgenic mouse model. *J Alzheimers Dis* 5, 301-8.

- Perez, M., Lim, F., Arrasate, M. and Avila, J. (2000b). The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J Neurochem* 74, 2583-9.
- Perez, M., Ribe, E., Rubio, A., Lim, F., Moran, M. A., Ramos, P. G., Ferrer, I., Isla, M. T. and Avila, J. (2005). Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation. *Neuroscience* 130, 339-47.
- Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A., De Lucia, M., McGowan, E., Lewis, J., Prihar, G. *et al.* (2004). CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet* 13, 703-14.
- Phillips, H. S., Hains, J. M., Armanini, M., Laramée, G. R., Johnson, S. A. and Winslow, J. W. (1991). BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7, 695-702.
- Pigino, G., Pelsman, A., Mori, H. and Busciglio, J. (2001). Presenilin-1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth, and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *J Neurosci* 21, 834-42.
- Planel, E., Miyasaka, T., Launey, T., Chui, D. H., Tanemura, K., Sato, S., Murayama, O., Ishiguro, K., Tatebayashi, Y. and 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, 2401-11.
- Planel, E., Richter, K. E., Nolan, C. E., Finley, J. E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman, M., Wang, L., Schachter, J. B. *et al.* (2007). Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci* 27, 3090-7.
- Plattner, F., Angelo, M. and Giese, K. P. (2006). The roles of cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase 3 in tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem*.
- Poorkaj, P., Bird, T. D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R. M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W. C., Raskind, M. and Schellenberg, G. D. (1998). Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43, 815-25.
- Pope, W. B., Lambert, M. P., Leypold, B., Seupaul, R., Sletten, L., Krafft, G. and Klein, W. L. (1994). Microtubule-associated protein tau is hyperphosphorylated during mitosis in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Exp Neurol* 126, 185-94.

- Porzig, R., Singer, D. and Hoffmann, R. (2007). Epitope mapping of mAbs AT8 and Tau5 directed against hyperphosphorylated regions of the human tau protein. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 644-9.
- Probst, A., Gotz, J., Wiederhold, K. H., Tolnay, M., Mistl, C., Jaton, A. L., Hong, M., Ishihara, T., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. *et al.* (2000). Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 99, 469-81.
- Qiang, L., Yu, W., Andreadis, A., Luo, M. and Baas, P. W. (2006). Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin. *J Neurosci* 26, 3120-9.
- Ramakrishnan, P., Dickson, D. W. and Davies, P. (2003). Pin1 colocalization with phosphorylated tau in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Neurobiol Dis* 14, 251-64.
- Ramsden, M., Kotilinek, L., Forster, C., Paulson, J., McGowan, E., SantaCruz, K., Guimaraes, A., Yue, M., Lewis, J., Carlson, G. *et al.* (2005). Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci* 25, 10637-47.
- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6364-9.
- Ribe, E. M., Perez, M., Puig, B., Gich, I., Lim, F., Cuadrado, M., Sesma, T., Catena, S., Sanchez, B., Nieto, M. *et al.* (2005). Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis* 20, 814-22.
- Riekkinen, P. J., Laulumaa, V., Sirvio, J., Soininen, H. and Helkala, E. L. (1987). Recent progress in the research of Alzheimer's disease. *Med Biol* 65, 83-8.
- Rissman, R. A., Poon, W. W., Blurton-Jones, M., Oddo, S., Torp, R., Vitek, M. P., LaFerla, F. M., Rohn, T. T. and Cotman, C. W. (2004). Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest* 114, 121-30.
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q. and Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750-4.
- Roger, B., Al-Bassam, J., Dehmelt, L., Milligan, R. A. and Halpain, S. (2004). MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol* 14, 363-71.

- Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M. and Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol (Berl)* 109, 5-13.
- Sahara, N., Lewis, J., DeTure, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Hutton, M. and Yen, S. H. (2002). Assembly of tau in transgenic animals expressing P301L tau: alteration of phosphorylation and solubility. *J Neurochem* 83, 1498-508.
- Sahara, N., Murayama, M., Mizoroki, T., Urushitani, M., Imai, Y., Takahashi, R., Murata, S., Tanaka, K. and Takashima, A. (2005). In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem* 94, 1254-63.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E. *et al.* (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 309, 476-81.
- Schwab, C., DeMaggio, A. J., Ghoshal, N., Binder, L. I., Kuret, J. and McGeer, P. L. (2000). Casein kinase 1 delta is associated with pathological accumulation of tau in several neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 21, 503-10.
- Segat, L., Pontillo, A., Annoni, G., Trabattoni, D., Vergani, C., Clerici, M., Arosio, B. and Crovella, S. (2007). PIN1 promoter polymorphisms are associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28, 69-74.
- Seitz, A., Kojima, H., Oiwa, K., Mandelkow, E. M., Song, Y. H. and Mandelkow, E. (2002). Single-molecule investigation of the interference between kinesin, tau and MAP2c. *Embo J* 21, 4896-905.
- Selden, S. C. and Pollard, T. D. (1986). Interaction of actin filaments with microtubules is mediated by microtubule-associated proteins and regulated by phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 466, 803-12.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1998). Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Arch Biochem Biophys* 357, 299-309.
- Sengupta, A., Novak, M., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2006). Regulation of phosphorylation of tau by cyclin-dependent kinase 5 and glycogen synthase kinase-3 at substrate level. *FEBS Lett* 580, 5925-33.
- Sergeant, N., Bombois, S., Ghestem, A., Drobecq, H., Kostanjevecki, V., Missiaen, C., Watez, A., David, J. P., Vanmechelen, E., Sergheraert, C. *et al.* (2003). Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J Neurochem* 85, 1581-91.

- Sergeant, N., Bussiere, T., Vermersch, P., Lejeune, J. P. and Delacourte, A. (1995). Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *Neuroreport* 6, 2217-20.
- Sergeant, N., David, J. P., Lefranc, D., Vermersch, P., Wattez, A. and Delacourte, A. (1997). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Lett* 412, 578-82.
- Sergeant, N., Delacourte, A. and Buee, L. (2005). Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739, 179-97.
- Seubert, P., Mawal-Dewan, M., Barbour, R., Jakes, R., Goedert, M., Johnson, G. V., Litersky, J. M., Schenk, D., Lieberburg, I., Trojanowski, J. Q. *et al.* (1995). Detection of phosphorylated Ser262 in fetal tau, adult tau, and paired helical filament tau. *J Biol Chem* 270, 18917-22.
- Sharma, V. M., Litersky, J. M., Bhaskar, K. and Lee, G. (2007). Tau impacts on growth-factor-stimulated actin remodeling. *J Cell Sci* 120, 748-57.
- Shen, M., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W. and Lu, K. P. (1998). The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev* 12, 706-20.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Yoshikawa, M., Kitada, T., Matsumine, H., Asakawa, S., Minoshima, S., Yamamura, Y., Shimizu, N. *et al.* (1999). Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol* 45, 668-72.
- Shimura, H., Miura-Shimura, Y. and Kosik, K. S. (2004a). Binding of tau to heat shock protein 27 leads to decreased concentration of hyperphosphorylated tau and enhanced cell survival. *J Biol Chem* 279, 17957-62.
- Shimura, H., Schwartz, D., Gygi, S. P. and Kosik, K. S. (2004b). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279, 4869-76.
- Smet, C., Wieruszeski, J. M., Buee, L., Landrieu, I. and Lippens, G. (2005). Regulation of Pin1 peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity by its WW binding module on a multi-phosphorylated peptide of Tau protein. *FEBS Lett* 579, 4159-64.
- Smith, P. D., Crocker, S. J., Jackson-Lewis, V., Jordan-Sciutto, K. L., Hayley, S., Mount, M. P., O'Hare, M. J., Callaghan, S., Slack, R. S., Przedborski, S. *et al.* (2003). Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13650-5.

- Sontag, E., Luangpirom, A., Hladik, C., Mudrak, I., Ogris, E., Speciale, S. and White, C. L., 3rd. (2004). Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β enzyme are associated with Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 287-301.
- Sperfeld, A. D., Collatz, M. B., Baier, H., Palmbach, M., Storch, A., Schwarz, J., Tatsch, K., Reske, S., Joosse, M., Heutink, P. *et al.* (1999). FTDP-17: an early-onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation. *Ann Neurol* 46, 708-15.
- Spillantini, M. G., Murrell, J. R., Goedert, M., Farlow, M. R., Klug, A. and Ghetti, B. (1998). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7737-41.
- Spires, T. L., Orne, J. D., SantaCruz, K., Pitstick, R., Carlson, G. A., Ashe, K. H. and Hyman, B. T. (2006). Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* 168, 1598-607.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A. *et al.* (1999). Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 155, 2153-65.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Geerts, H., Mercken, M., Bruynseels, K., Lasrado, R., Vandezande, K., Laenen, I., Boon, T. *et al.* (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, 41340-9.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. In *J Cell Biol*, vol. 156, pp. 1051-63.
- Steinhilb, M. L., Dias-Santagata, D., Mulkearns, E. E., Shulman, J. M., Biernat, J., Mandelkow, E. M. and Feany, M. B. (2007). S/P and T/P phosphorylation is critical for tau neurotoxicity in *Drosophila*. *J Neurosci Res* 85, 1271-1278.
- Stoothoff, W. H. and Johnson, G. V. (2005). Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 1739, 280-97.
- Suh, Y. H. and Checler, F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* 54, 469-525.
- Sultana, R., Boyd-Kimball, D., Poon, H. F., Cai, J., Pierce, W. M., Klein, J. B., Markesbery, W. R., Zhou, X. Z., Lu, K. P. and Butterfield, D. A. (2006). Oxidative modification and

- down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging* 27, 918-25.
- Takashima, A., Honda, T., Yasutake, K., Michel, G., Murayama, O., Murayama, M., Ishiguro, K. and Yamaguchi, H. (1998a). Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta by amyloid beta peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 31, 317-23.
- Takashima, A., Murayama, M., Murayama, O., Kohno, T., Honda, T., Yasutake, K., Nihonmatsu, N., Mercken, M., Yamaguchi, H., Sugihara, S. *et al.* (1998b). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9637-41.
- Takashima, A., Noguchi, K., Michel, G., Mercken, M., Hoshi, M., Ishiguro, K. and Imahori, K. (1996). Exposure of rat hippocampal neurons to amyloid beta peptide (25-35) induces the inactivation of phosphatidylinositol-3 kinase and the activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta. *Neurosci Lett* 203, 33-6.
- Takeda, A., Smith, M. A., Avila, J., Nunomura, A., Siedlak, S. L., Zhu, X., Perry, G. and Sayre, L. M. (2000). In Alzheimer's disease, heme oxygenase is coincident with Alz50, an epitope of tau induced by 4-hydroxy-2-nonenal modification. *J Neurochem* 75, 1234-41.
- Takei, Y., Teng, J., Harada, A. and Hirokawa, N. (2000). Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150, 989-1000.
- Tanemura, K., Akagi, T., Murayama, M., Kikuchi, N., Murayama, O., Hashikawa, T., Yoshiike, Y., Park, J. M., Matsuda, K., Nakao, S. *et al.* (2001). Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis* 8, 1036-45.
- Tanemura, K., Chui, D. H., Fukuda, T., Murayama, M., Park, J. M., Akagi, T., Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Kimura, T., Hashikawa, T. *et al.* (2006). Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1). *J Biol Chem* 281, 5037-41.
- Tanemura, K., Murayama, M., Akagi, T., Hashikawa, T., Tominaga, T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H. and Takashima, A. (2002). Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci* 22, 133-41.

- Taniguchi, T., Doe, N., Matsuyama, S., Kitamura, Y., Mori, H., Saito, N. and Tanaka, C. (2005). Transgenic mice expressing mutant (N279K) human tau show mutation dependent cognitive deficits without neurofibrillary tangle formation. *FEBS Lett* 579, 5704-12.
- Tatebayashi, Y., Haque, N., Tung, Y. C., Iqbal, K. and Grundke-Iqbal, I. (2004). Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci* 117, 1653-63.
- Tatebayashi, Y., Miyasaka, T., Chui, D. H., Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K. *et al.* (2002). Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13896-901.
- Terwel, D., Dewachter, I. and Van Leuven, F. (2002). Axonal transport, tau protein, and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med* 2, 151-65.
- Terwel, D., Lasrado, R., Snauwaert, J., Vandeweert, E., Van Haesendonck, C., Borghgraef, P. and Van Leuven, F. (2005). Changed conformation of mutant Tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of Tau-4R/2N transgenic mice. *J Biol Chem* 280, 3963-73.
- Thorpe, J. R., Mosaheb, S., Hashemzadeh-Bonehi, L., Cairns, N. J., Kay, J. E., Morley, S. J. and Rulten, S. L. (2004). Shortfalls in the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase protein Pin1 in neurons are associated with frontotemporal dementias. *Neurobiol Dis* 17, 237-49.
- Trojanowski, J. Q., Smith, A. B., Hurn, D. and Lee, V. M. (2005). Microtubule-stabilising drugs for therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders with axonal transport impairments. *Expert Opin Pharmacother* 6, 683-6.
- Tsai, L. H., Lee, M. S. and Cruz, J. (2004). Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Biochim Biophys Acta* 1697, 137-42.
- Tseng, H. C., Zhou, Y., Shen, Y. and Tsai, L. H. (2002). A survey of Cdk5 activator p35 and p25 levels in Alzheimer's disease brains. *FEBS Lett* 523, 58-62.
- Van den Haute, C., Spittaels, K., Van Dorpe, J., Lasrado, R., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H. and Van Leuven, F. (2001). Coexpression of human cdk5 and its activator p35 with human protein tau in neurons in brain of triple transgenic mice. *Neurobiol Dis* 8, 32-44.
- Vidal, M., Morris, R., Grosveld, F. and Spanopoulou, E. (1990). Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *Embo J* 9, 833-40.

- Vincent, I., Jicha, G., Rosado, M. and Dickson, D. W. (1997). Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci* 17, 3588-98.
- Vincent, I., Rosado, M. and Davies, P. (1996). Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J Cell Biol* 132, 413-25.
- Vincent, I., Zheng, J. H., Dickson, D. W., Kress, Y. and Davies, P. (1998). Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 19, 287-96.
- Vogelsberg-Ragaglia, V., Bruce, J., Richter-Landsberg, C., Zhang, B., Hong, M., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2000). Distinct FTDP-17 missense mutations in tau produce tau aggregates and other pathological phenotypes in transfected CHO cells. *Mol Biol Cell* 11, 4093-104.
- von Bergen, M., Barghorn, S., Biernat, J., Mandelkow, E. M. and Mandelkow, E. (2005). Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta* 1739, 158-66.
- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2007a). Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci* 25, 59-68.
- Wang, Y. P., Biernat, J., Pickhardt, M., Mandelkow, E. and Mandelkow, E. M. (2007b). Stepwise proteolysis liberates tau fragments that nucleate the Alzheimer-like aggregation of full-length tau in a neuronal cell model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10252-7.
- Ward, W. F. (2002). Protein degradation in the aging organism. *Prog Mol Subcell Biol* 29, 35-42.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-62.
- Wen, Y., Yang, S., Liu, R. and Simpkins, J. W. (2004). Transient cerebral ischemia induces site-specific hyperphosphorylation of tau protein. *Brain Res* 1022, 30-8.
- Williamson, R., Scales, T., Clark, B. R., Gibb, G., Reynolds, C. H., Kellie, S., Bird, I. N., Vardell, I. M., Sheppard, P. W., Everall, I. *et al.* (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.
- Wiltfang, J., Esselmann, H., Bibl, M., Smirnov, A., Otto, M., Paul, S., Schmidt, B., Klafki, H. W., Maler, M., Dyrks, T. *et al.* (2002). Highly conserved and disease-specific patterns of carboxyterminally truncated Abeta peptides 1-37/38/39 in addition to 1-40/42 in

- Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J Neurochem* 81, 481-96.
- Wintjens, R., Wieruszeski, J. M., Drobecq, H., Rousselot-Pailley, P., Buee, L., Lippens, G. and Landrieu, I. (2001). 1H NMR study on the binding of Pin1 Trp-Trp domain with phosphothreonine peptides. *J Biol Chem* 276, 25150-6.
- Wittmann, C. W., Wszolek, M. F., Shulman, J. M., Salvaterra, P. M., Lewis, J., Hutton, M. and Feany, M. B. (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 293, 711-4.
- Woods, Y. L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X. and Proud, C. G. (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, 609-15.
- Y**affe, M. B., Schutkowski, M., Shen, M., Zhou, X. Z., Stukenberg, P. T., Rahfeld, J. U., Xu, J., Kuang, J., Kirschner, M. W., Fischer, G. *et al.* (1997). Sequence-specific and phosphorylation-dependent proline isomerization: a potential mitotic regulatory mechanism. *Science* 278, 1957-60.
- Yamauchi, P. S. and Purich, D. L. (1993). Microtubule-associated protein interactions with actin filaments: evidence for differential behavior of neuronal MAP-2 and tau in the presence of phosphatidyl-inositol. *Biochem Biophys Res Commun* 190, 710-5.
- Yasojima, K., Kuret, J., DeMaggio, A. J., McGeer, E. and McGeer, P. L. (2000). Casein kinase 1 delta mRNA is upregulated in Alzheimer disease brain. *Brain Res* 865, 116-20.
- Yoshida, H. and Goedert, M. (2006). Sequential phosphorylation of tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38delta or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope. *J Neurochem* 99, 154-64.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 53, 337-51.
- Yu, J.-Z. and Rasenick, M. M. (2006). Tau associates with actin in differentiating PC12 cells. *Faseb J* 20, 1452-1461.
- Yu, W. H., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O. *et al.* (2005). Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98.

- Yuan, Z., Agarwal-Mawal, A. and Paudel, H. K. (2004). 14-3-3 binds to and mediates phosphorylation of microtubule-associated tau protein by Ser9-phosphorylated glycogen synthase kinase 3beta in the brain. *J Biol Chem* 279, 26105-14.
- Zachara, N. E. and Hart, G. W. (2002). The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem Rev* 102, 431-8.
- Zehr, C., Lewis, J., McGowan, E., Crook, J., Lin, W. L., Godwin, K., Knight, J., Dickson, D. W. and Hutton, M. (2004). Apoptosis in oligodendrocytes is associated with axonal degeneration in P301L tau mice. *Neurobiol Dis* 15, 553-62.
- Zhang, B., Higuchi, M., Yoshiyama, Y., Ishihara, T., Forman, M. S., Martinez, D., Joyce, S., Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. (2004). Retarded axonal transport of R406W mutant tau in transgenic mice with a neurodegenerative tauopathy. *J Neurosci* 24, 4657-67.
- Zhang, J. Y., Liu, S. J., Li, H. L. and Wang, J. Z. (2005). Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system. *J Neural Transm* 112, 547-55.
- Zheng-Fischhofer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E. M., Illenberger, S., Godemann, R. and Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* 252, 542-52.
- Zhou, X. Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P. J., Shen, M., Stoller, G., Kullertz, G., Stark, M., Fischer, G. and Lu, K. P. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Mol Cell* 6, 873-83.

Annexes

Annexe 1 : Références des études de mise en évidence *in vitro* des Protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau et sites de phosphorylation.

Abr : PDPK : « Proline Directed Protein Kinases », N-PDPK : « Non-Proline Directed Protein Kinases », BI : Kinases à la fois PDPK et N-DPK et YK : « Tyrosine Kinases »

- [1] Baudier, J. and Cole, R. D., 1987. *J Biol Chem* 262, 17577-83.
- [2] Baumann, K. *et al.*, 1993. *FEBS Lett* 336, 417-24.
- [3] Billingsley, M. L. and Kincaid, R. L., 1997. *Biochem J* 323 (Pt 3), 577-91.
- [4] Correas, I. *et al.*, 1992. *J Biol Chem* 267, 15721-8.
- [5] Drewes, G. *et al.*, 1992. *Embo J* 11, 2131-8.
- [6] Drewes, G. *et al.*, 1995. *J Biol Chem* 270, 7679-88.
- [7] Godemann, R. *et al.*, 1999. *FEBS Lett* 454, 157-64.
- [8] Goedert, M. *et al.*, 1997. *FEBS Lett* 409, 57-62.
- [9] Greenwood, J. A. *et al.*, 1994. *J Biol Chem* 269, 4373-80.
- [10] Hamdane, M. *et al.*, 2003. *J Biol Chem* 278, 34026-34.
- [11] Hanger, D. P. *et al.*, 1992. *Neurosci Lett* 147, 58-62.
- [12] Hasegawa, M. *et al.*, 1997. *J Biol Chem* 272, 33118-24.
- [13] Hasegawa, M. *et al.*, 1996. *FEBS Lett* 384, 25-30.
- [14] Hernandez, F. *et al.*, 2003. *Neurobiol Aging* 24, 1087-94.
- [15] Ishiguro, K. *et al.*, 1992. *Neurosci Lett* 148, 202-6.
- [16] Jicha, G. A. *et al.*, 1999. *J Neurosci* 19, 7486-94.
- [17] Johnson, G. V., 1992. *J Neurochem* 59, 2056-62.
- [18] Ksiezak-Reding, H. *et al.*, 2003. *Biochim Biophys Acta* 1639, 159-68.
- [19] Lee, G. *et al.*, 2004. *J Neurosci* 24, 2304-12.
- [20] Li, G. *et al.*, 2004. *J Biol Chem* 279, 15938-45.
- [21] Litersky, J. M. *et al.*, 1996. *Biochem J* 316 (Pt 2), 655-60.
- [22] Liu, F. *et al.*, 2002. *FEBS Lett* 530, 209-14.
- [23] Lovestone, S. *et al.*, 1994. *Curr Biol* 4, 1077-86.
- [24] Lund, E. T. *et al.*, 2001. *J Neurochem* 76, 1221-32.
- [25] Mandelkow, E. M. *et al.*, 1992. *FEBS Lett* 314, 315-21.
- [26] Paudel, H. K., 1997. *J Biol Chem* 272, 1777-85.
- [27] Reynolds, C. H. *et al.*, 2000. *J Neurochem* 74, 1587-95.
- [28] Reynolds, C. H. *et al.*, 1997. *J Neurochem* 69, 191-8.
- [29] Reynolds, C. H. *et al.*, 1997. *J Neurochem* 68, 1736-44.
- [30] Roder, H. M. *et al.*, 1997. *J Biol Chem* 272, 4509-15.
- [31] Sato, S. *et al.*, 2006. *J Neurochem* 98, 1573-84.
- [32] Schneider, A. *et al.*, 1999. *Biochemistry* 38, 3549-58.
- [33] Scott, C. W. *et al.*, 1993. *J Biol Chem* 268, 1166-73.
- [34] Sengupta, A. *et al.*, 2006. *FEBS Lett* 580, 5925-33.
- [35] Sironi, J. J. *et al.*, 1998. *FEBS Lett* 436, 471-5.
- [36] Steiner, B. *et al.*, 1990. *Embo J* 9, 3539-44.
- [37] Taniguchi, T. *et al.*, 2001. *J Biol Chem* 276, 10025-31.
- [38] Tomizawa, K. *et al.*, 2001. *FEBS Lett* 492, 221-7.
- [39] Wang, J. Z. *et al.*, 1998. *FEBS Lett* 436, 28-34.
- [40] Williamson, R. *et al.*, 2002. *J Neurosci* 22, 10-20.
- [41] Woods, Y. L. *et al.*, 2001. *Biochem J* 355, 609-15.
- [42] Yamamoto, H. *et al.*, 2002. *Arch Biochem Biophys* 408, 255-62.
- [43] Yang, S. D. *et al.*, 1993. *J Neurochem* 61, 1742-7.

Annexe 2 : Références des études de mise en évidence *in vivo* des protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau et sites de phosphorylation.

Abr : PDPK : « *Proline Directed Protein Kinases* », N-PDPK : « *Non-Proline Directed Protein Kinases* », BI : Kinases à la fois PDPK et N-DPK et YK : « *Tyrosine Kinases* »

- [1] Biernat, J. *et al.*, 2002. *Mol Biol Cell*
- [2] Buee-Scherrer, V. and Goedert, M., 2002. *FEBS Lett*
- [3] Cho, J. H. and Johnson, G. V., 2003. *J Biol Chem*
- [4] Cruz, J. C. *et al.*, 2003. *Neuron*
- [5] Derkinderen, P. *et al.*, 2005. *J Neurosci*
- [6] Hamdane, M. *et al.*, 2003. *J Biol Chem*
- [7] Hashiguchi, M. *et al.*, 2002. *J Biol Chem*
- [8] Hong, M. *et al.*, 1997. *J Biol Chem*
- [9] Hong, M. and Lee, V. M., 1997. *J Biol Chem*
- [10] Jenkins, S. M. and Johnson, G. V., 2000. *J Neurochem*
- [11] Jenkins, S. M. *et al.*, 2000. *Biochem J*
- [12] Kyoung Pyo, H. *et al.*, 2004. *Neuroscience*
- [13] Lee, G. *et al.*, 2004. *J Neurosci*
- [14] Li, G. *et al.*, 2004. *J Biol Chem*
- [15] Lovestone, S. *et al.*, 1999. *Biol Psychiatry*
- [16] Lovestone, S. *et al.*, 1994. *Curr Biol*
- [17] Lucas, J. J. *et al.*, 2001. *Embo J*
- [18] Michel, G. *et al.*, 1998. *Biochim Biophys Acta*
- [19] Nishimura, I. *et al.*, 2004. *Cell*
- [20] Patrick, G. N. *et al.*, 1999. *Nature*
- [21] Sato, S. *et al.*, 2006. *J Neurochem*
- [22] Spittaels, K. *et al.*, 2000. *J Biol Chem*
- [23] Taniguchi, T. *et al.*, 2001. *J Biol Chem*
- [24] Trinczek, B. *et al.*, 2004. *J Biol Chem*
- [25] Wagner, U. *et al.*, 1996. *J Cell Sci*
- [26] Xie, H. *et al.*, 1998. *Brain Res*

Annexe 3 : Publication annexe à la thèse (sous presse)

Leroy K., **Bretteville A.**, Schindowski K., Gilissen E., Authalet M., De Decker R., Yilmaz Z., Buée L, Brion ., J.P. Hippocampal atrophy, severe axonopathy and neurofibrillary tangles without neuronal loss in a mutant Tau transgenic mice (2007). *American Journal of Pathology*

Early Axonopathy Preceding Neurofibrillary Tangles in Mutant Tau Transgenic Mice

Karelle Leroy,* Alexis Bretteville,[†]
Katharina Schindowski,[†] Emmanuel Gilissen,*
Michèle Authelet,* Robert De Decker,*
Zehra Yilmaz,* L. Buée,[†] and Jean-Pierre Brion*

From the Laboratory of Histology, Neuroanatomy, and Neuropathology,* School of Medicine, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium; and INSERM U837 and Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique,[†] Jean-Pierre Aubert Research Centre, Faculté de Médecine, Université Lille2, Lille, France

Neurodegenerative diseases characterized by brain and spinal cord involvement often show widespread accumulations of tau aggregates. We have generated a transgenic mouse line (Tg30tau) expressing in the forebrain and the spinal cord a human tau protein bearing two pathogenic mutations (P301S and G272V). These mice developed age-dependent brain and hippocampal atrophy, central and peripheral axonopathy, progressive motor impairment with neurogenic muscle atrophy, and neurofibrillary tangles and had decreased survival. Axonal spheroids and axonal atrophy developed early before neurofibrillary tangles. Neurofibrillary inclusions developed in neurons at 3 months and were of two types, suggestive of a selective vulnerability of neurons to form different types of fibrillary aggregates. A first type of tau-positive neurofibrillary tangles, more abundant in the forebrain, were composed of ribbon-like 19-nm-wide filaments and twisted paired helical filaments. A second type of tau and neurofilament-positive neurofibrillary tangles, more abundant in the spinal cord and the brainstem, were composed of 10-nm-wide neurofilaments and straight 19-nm filaments. Unbiased stereological analysis indicated that total number of pyramidal neurons and density of neurons in the lumbar spinal cord were not reduced up to 12 months in Tg30tau mice. This Tg30tau model thus provides evidence that axonopathy precedes tangle formation and that both lesions can be dissociated from overt neuronal loss in selected brain areas but not from neuronal dysfunction. (*Am J Pathol* 2007, 171:000–000; DOI: 10.2353/ajpath.2007.070345)

Many neurodegenerative diseases are characterized by the presence of filamentous aggregates in neurons and/or in glial cells and composed of abnormally and hyperphosphorylated forms of the microtubule-associated protein tau. These diseases have been referred to as tauopathies¹ and include some forms of frontotemporal dementia, Pick's disease, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, and Alzheimer's disease (AD). Several of these tauopathies are characterized by both cognitive and motor dysfunction and widespread tau pathology in brain, brainstem, and spinal cord. For example, cognitive dysfunction and extrapyramidal symptoms are observed in patients with corticobasal degeneration or progressive supranuclear palsy. In the Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex,² and in a subset of frontotemporal dementia,³ patients present with motorneuron disease and dementia. Although most cases of familial frontotemporal dementia have been recently found to be caused by mutations in the progranulin gene, pathogenic mutations in the tau gene have also been identified in familial forms of frontotemporal lobar degeneration.⁴ Tau protein binds to microtubules and is involved in regulation of the stability of microtubules, axoplasmic transport, and axonal differentiation.^{5,6} In frontotemporal lobar degeneration with tau gene mutation, their functional effects might be attributable to a loss of function mechanism by virtue of decreased microtubule binding but might also be attributable to a gain of toxic function because some of these mutations either increase binding to microtubules or increase the aggregation properties of the mutant tau proteins. Transgenic mice overexpressing wild-type human tau^{7–12} or pathogenic mutant tau G272V,¹³ P301L,^{14–16}

Supported by grants from the Belgian PAI phase VI, the FRSM, the SAO/FRMA, the Van Buuren and Génicot Foundations (to J.P.B.), the Centre National de la Recherche Scientifique (to L.B.), the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (to L.B.), Gis-Longévité (to L.B.), the ANR-05-BLANC-0320-01 (to L.B.), the Marie Curie Fellowship (to K.S.), and the Région Nord/Pas-de-Calais and Centre Hospitalier Régional Universitaire-Lille (scholarship to A.B.).

Accepted for publication June 7, 2007.

Supplemental material for this article can be found on <http://ajp.amjpathol.org>.

Address reprint requests to Dr. Jean-Pierre Brion, Laboratory of Histology and Neuropathology, Université Libre de Bruxelles, School of Medicine, 808, Route de Lennik, Bldg. G, 1070 Brussels, Belgium. E-mail: jbrion@ulb.ac.be.

Fn1

AQ: I

P301S,^{17,18} V337M,¹⁹ and R406W^{20,21} have been developed. Neurofibrillary tangles (NFTs) developed in mice expressing mutant tau, but the exact relationship between their formation and neuronal dysfunction and death has not been firmly established. Recent findings suggested that formation of NFTs could be dissociated from other pathologies in P301L mutant tau mice.^{16,22} To investigate the relationship between NFT formation and pathological phenotypes in other mutant tau models, we have generated a new transgenic mouse line (Tg30tau) expressing in the forebrain and the spinal cord a human tau protein bearing two pathogenic mutations (P301S and G272V). The P301S tau mutation causes frontotemporal dementia (FTD) or corticobasal degeneration²³ and is associated to widespread tau pathology and an early age of onset. The G272V mutation²⁴ was identified in a Dutch family with FTDP-17.²⁵ We previously characterized another tau transgenic line expressing this mutant tau protein only in the forebrain and developing neurofibrillary lesions in the hippocampus and the cortex: these mice showed delayed learning and reduced spatial memory but no motor deficits.²⁶ The transgenic mice described here developed brain atrophy and a motor neuron disease with axonopathy preceding neurofibrillary pathology and without overt neuronal loss in the hippocampus and the spinal cord, suggesting that these lesions can lead to neuronal dysfunction without cell death in these brain areas.

Materials and Methods

Generation of Transgenic Mice

The generation of transgenic line Tg30tau has been previously reported,²⁶ but the pathological analysis of line Tg30tau has not been described before and is presented here. These mice express a mutant tau transgene (1N4R human tau isoform) mutated at positions G272V and P301S, under the control of a modified thy-1 promoter to drive expression in neurons.^{27,28} Only heterozygous animals were used in the present study; nontransgenic littermates were used as wild-type controls. Transgenic animals were identified by polymerase chain reaction amplification of the tau transgene in genomic DNA as reported.²⁹ All studies on animals were performed in compliance and following approval of the school of medicine ethics committee for animal care and use.

Motor Testing

Motor deficits in Tg30tau mice were assessed by testing on a Rotarod apparatus (Ugo Basile, Comerio, Italy) at 8, 10, and 12 months of age. Animals were first submitted to training sessions (three trials per day during 3 consecutive days) during which they were placed on the rod rotating at constant speed (4 rpm). Animals were individually separated the day before the test and randomly evaluated on two consecutive test sessions, using an experimental setting of progressive acceleration from 4 to 40 rpm throughout 300 seconds. The latency to fall off the

Rotarod was recorded. Animals staying up to 300 seconds were removed from the Rotarod, and their latency to fall recorded as 300 seconds.

Histological Staining

The brains and spinal cords of wild-type and Tg30tau transgenic mice were dissected at 1, 3, 6, and 12 months. After wet weight estimation, tissues were fixed in 10% formalin or in 4% (w/v) paraformaldehyde and embedded in paraffin. Formalin-fixed sections (10- μ m thick) were stained with hematoxylin and eosin, with the Nissl method, with the Gallyas silver-staining method, or with Congo Red and thioflavin. Tissue sections were examined with a Zeiss Axioplan microscope (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany) and digital images acquired using an Axiocam HRc camera (Carl Zeiss). The density of Gallyas-positive cell profiles in the cortex, in the hippocampus, and in the spinal cord was expressed as the total number of Gallyas-positive cell profiles visible on whole sagittal (cortex and hippocampus) or coronal (lumbar spinal cord) tissue section of 3-, 6-, and 12-month-old mice ($n = 3$ different animals at each age).

Antibodies

The B19 antibody is a rabbit polyclonal antibody raised to adult bovine tau proteins, reacting with all adult and fetal tau isoforms in bovine, rat, mouse, and human nervous tissue in a phosphorylation-independent manner.³⁰ The TP20 and M19G rabbit polyclonal antibodies were raised against a synthetic peptide of human tau and react with human tau and not with mouse tau.^{8,31} The TP007 and TP70 rabbit polyclonal antibodies were raised against synthetic peptides mapping at the extreme N and C termini of human tau, respectively.^{32,33} The anti-cleaved tau (Asp421) mouse monoclonal antibody was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). The mouse monoclonal antibody AD2 is specific for tau phosphorylated at Ser396.³¹ The AT8, AT180, AT270, and AT100 mouse monoclonal antibodies (purchased from Innogenetics, Ghent, Belgium) are specific for tau phosphorylated at Ser202 and Thr205 (AT8),³⁴ at Thr231 (AT180), at Thr181 (AT270),³⁵ and a specific PHF-tau epitope involving phosphorylation at Thr212 and Ser214 (AT100).³⁶ The mouse monoclonal antibodies PHF-1 (kindly provided by Drs. P. Davies and S. Greenberg, New York) and AP422 (kindly provided by Drs. M. Hasegawa and M. Goedert, Cambridge, UK) are specific for tau phosphorylated at Ser396/404 and Ser422, respectively.^{37,38} The tau monoclonal antibody MC1 (kindly provided by Dr. P. Davies) recognizes a conformational epitope requiring both an N-terminal fragment and a C-terminal fragment.³⁹ BioSource (Nivelles, Belgium) provided the phosphospecific rabbit polyclonal tau antibodies to pThr212, pSer214, pSer262, pThr403, and pSer409. The mouse monoclonal antibody to ubiquitin (clone MAB1510) was from Chemicon (Temecula, CA). The mouse monoclonal antibodies to α -tubulin (clone

DM1-A), to β -actin (clone AC15), and to GFAP (clone GA5) were from Sigma (Bornem, Belgium). The polyclonal rabbit antibodies to neurofilament L (NA1214) and M (NA1216), to phosphorylated neurofilament H (NA 1211) and the mouse monoclonal antibody to neurofilament H (clone SMI32) and phosphorylated neurofilament H (SMI31) were from Affiniti (Exeter, UK). The anti-phosphotyrosine antibodies 4G10 and PT-66 were purchased from Upstate Biotechnology and Sigma. For detection of A β , we used a polyclonal antibody raised to amino acids 12 to 28 of the A β peptide.⁴⁰

Several antibodies to protein kinases or phosphatases were also used. The mouse monoclonal antibodies to cdc2 (clone 17) and cdk5 (clone DC17) and polyclonal antibodies to cdk5 (C-8 and H291), p35, ERK1 (C-16), and casein kinase Id (R-19) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The mouse monoclonal antibody to ERK1 was from Affiniti and to Jun kinase (phospho Thr183/Tyr185) from Cell Signaling. The anti-GSK-3 β (TPK1) antibody was from Transduction Laboratories (San Jose, CA). The antibodies to GSK-3 phosphorylated on Tyr216 were from BioSource and from Upstate Biotechnology. The antibody to active caspase3 was from Promega.

Preparation of Brain Homogenates and Western Blot Analysis

Brain and spinal cord of Tg30tau and wild-type mice were quickly dissected after lethal anesthesia and separately homogenized in a buffer containing proteases and phosphatase inhibitors (50 mmol/L Tris, 10 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid, pH 7.4, 1 mmol/L phenylmethyl sulfonyl fluoride, 25 μ g/ml leupeptin, 25 μ g/ml pepstatin, 1 mmol/L Na₃VO₄, 10 mmol/L Na₄P₂O₇·10 H₂O, and 20 mmol/L NaF). Samples were mixed with sodium dodecyl sulfate sample buffer containing a reducing agent and then boiled at 100°C for 10 minutes (all done as recommended by Invitrogen). For Western blot analysis, 10 μ g of total protein was separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (NuPAGE; Invitrogen, Carlsbad, CA), blotted onto nitrocellulose or polyvinylidene difluoride membranes (Hybond and Hybond Phosphate from Amersham/GE Health Care, Orsay, France). The membranes were blocked and incubated with the appropriate primary antibody and then incubated with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit A4914 from Sigma-Aldrich, Lyon, France; and horse anti-mouse from Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finally, the peroxidase activity was detected with the ECL detection kit and visualized with Hyperfilm ECL (Amersham/GE Health Care).

Immunocytochemistry and Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) Staining

The immunohistochemical labeling was performed using the ABC method. In brief, tissue sections were treated

with H₂O₂ to inhibit endogenous peroxidase and incubated with the blocking solution [10% (v/v) normal horse serum in Tris-buffered saline (0.01 mol/L Tris and 0.15 mol/L NaCl, pH 7.4)]. After an overnight incubation with the diluted primary antibody, the sections were sequentially incubated with horse anti-mouse antibodies conjugated to biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) followed by the ABC complex (Vector). The peroxidase activity was revealed using diaminobenzidine as chromogen. For immunolabeling with the A β antibodies, rehydrated tissue sections were pretreated with 100% formic acid for 10 minutes before incubation with the blocking solution.

Double immunolabeling was performed using fluorescent markers. The first antibody was detected using an anti-rabbit or an anti-mouse antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (Jackson), and the second antibody was detected using an anti-rabbit or an anti-mouse antibody conjugated to biotin, followed by streptavidin conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes). Double immunolabeling was followed by nuclear 4,6-diamidino-2-phenylindole staining. Selected areas in tissue sections were photographed after double-fluorescent immunolabeling and stained with the Gallyas silver staining method to identify neurons containing fibrillary material. The number of phosphotau-positive cell profiles in the cortex, in the hippocampus, and in the gray matter of the spinal cord was determined in 3-, 6-, and 12-month-old mice as described above for Gallyas staining. TUNEL staining was performed on tissue sections to detect DNA cleavage associated with apoptotic cell death using digoxigenin-dUTP, as previously reported.⁴¹

Stereological Analysis

For stereological analysis, wild-type and transgenic animals were intracardially perfused with 10% (v/v) formalin, and their brain and spinal cord were dissected and embedded in paraffin. Brains and lumbar spinal cord were serially cut in coronal sections (15- μ m thickness) that were then stained with Cresyl violet. The total numbers of hippocampal pyramidal cells was estimated in the left hemispheres of 12-month-old transgenic mice ($n = 3$) and wild-type mice ($n = 3$). For each animal, 10 coronal sections at 75- μ m intervals throughout the hippocampal pyramidal cell layer were used. The pyramidal cell layer was delineated as depicted in Figure 3C. Counting of total numbers of neurons was performed with a $\times 100/1.30$ oil objective by using a random-sampling stereological counting tool, the optical fractionator,^{42,43} which is implemented within a stereology workstation consisting of a modified light microscope (Leica DMR, Wetzlar, Germany), Leica PL Fluotar objectives ($\times 10/0.30$; $\times 100/1.30$ oil), a motorized specimen stage for automatic sampling (BioPoint 2; Ludl Electronic Products, Hawthorne, NY), an electronic microcator (Heidenhain, Traunreut, Germany), a charge-coupled device color video camera (HV-C20A; Hitachi, Tokyo, Japan), and a personnel computer with stereology software (Stereoinvestigator version 5.05.4; MicroBrightField,

Inc., Colchester, VT). Optical dissectors were automatically randomly distributed throughout the delineated area, and each pyramidal cell whose nuclear top came into focus within an optical dissector was counted. Estimated total numbers of pyramidal cells per specimen were hence calculated from the number of counted neurons, the volume of the pyramidal cell layer, and the sampling probability.⁴⁴ Supplemental Table 1 (see <http://ajp.amjpathol.org>) summarizes the details of the counting procedure. For measuring the volume of the hippocampal pyramidal cell layer, the projection area of this cell layer was delineated on the sections used for cell counting, and its projection area was measured on all analyzed sections using the above described stereology workstation and stereology software with the $\times 10/0.30$ objective. This projection area, the corresponding average actual section thickness after histological preparation, and the distance between sections were used to calculate the total volume of the hippocampal pyramidal cell layer by means of Cavalieri's principle.⁴⁵ This method was also used to calculate the total volume of the hippocampus and its subfields.

An estimation of neuronal density in the anterior horn of the lumbar spinal cord of 12-month-old transgenic mice ($n = 3$) and wild-type mice ($n = 3$) was made with the optical dissector method. For each animal, five coronal sections at 75- μm intervals were used. Z-stacks of sequential pictures of the anterior horn of the spinal cord were taken with an Axiocam camera and Axiovision software on a motorized light microscope (Zeiss Axiovert 200M) using a planapochromat $\times 63/1.40$ oil objective. For each section, neurons were counted in two counting boxes ($207 \times 165 \times 8 \mu\text{m}$) randomly placed in the anterior horn of the spinal cord. All neurons whose nucleolus came into focus in the counting box disposed inside the Z-stack were counted in Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The density of neurons was estimated from the numbers of counted neurons per volume of spinal gray matter estimated according to Cavalieri's principle.

Sciatic Nerves and Muscle Analysis

Sciatic nerve were dissected in transgenic and non-transgenic animals at 1, 3, and 12 months and fixed by immersion in 4% (w/v) glutaraldehyde in Millonig's buffer, pH 7.4, for 90 minutes. After washing in Millonig's buffer with 0.5% (w/v) glucose for 24 hours, the tissue samples were postfixed in 2% (w/v) OsO_4 for 30 minutes, dehydrated, and embedded in Epoxy resin LX112. Semithin cross sections (1 μm thickness) of the sciatic nerves were performed, stained with toluidine blue, photographed, and analyzed with the NIH Image J program: the total nerve area was measured using manual selection, and the total number of axons cross sections and their area were counted using the analyze particle function after image thresholding. Statistical analysis was performed using the Prism 4 software program (GraphPad Software). Blocks of tissue muscle from the quadriceps femoris were fixed in formalin,

embedded in paraffin, and cut transversally to obtain cross sections of muscle fibers. Muscle tissue sections were stained with hematoxylin and eosin and the area of at least 50 muscle fibers/animal was manually measured with Image J.

Ultrastructural Analysis in Electron Microscopy

Control and transgenic animals were anesthetized with chloral hydrate and perfused intracardially with a solution of 2% (w/v) paraformaldehyde and 2% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 7.4. Tissue blocks of the spinal cord, sciatic nerves, hippocampus, and cerebral cortex were quickly dissected and further fixed by immersion in 4% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer at pH 7.4 for 90 minutes. After washing in Millonig's buffer with 0.5% (w/v) sucrose for 24 hours, the tissue blocks were postfixed in 2% (w/v) OsO_4 for 30 minutes, dehydrated, and embedded in Epon. Semithin sections were stained with toluidine blue. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Zeiss EM 809 microscope at 80 kV. Measurements of the diameter of microtubules, neurofilaments, and abnormal filaments were performed on digitalized images.

AQ: E

Immunolabeling in Electron Microscopy

For immunolabeling, animals were perfused with a solution of 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.5% (v/v) glutaraldehyde. Fifty- μm -thick tissue sections were cut on a vibratome, cryoprotected by incubation in 30% (w/v) sucrose, and frozen in isopentane cooled at -80°C . After thawing, the tissue sections were treated with 1% (w/v) sodium borohydride for 30 minutes and processed for immunolabeling with the ABC method, as reported (Brion et al, 1999). Other tissue blocks were dehydrated, and embedded in LR White resin; the resin was polymerized at 50°C for 24 hours (Agar SL, UK). Ultrathin sections were used for postembedding immunolabeling with the immunogold method and the silver-enhancing method. In brief, ultrathin sections were incubated with 10% normal serum in Tris-buffered saline (0.1 mol/L Tris-HCl and 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0) containing 1% normal serum, 0.1% Tween 20, 1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide for 10 minutes, followed by overnight incubation with the primary antibody diluted in the same buffer. After washing, the sections were incubated with gold-conjugated antibodies (BBInternational, Cardiff, UK), washed, and counterstained with lead citrate. For double labeling, sections were first immunolabeled with the primary antibody followed by a secondary antibody conjugated to biotin and streptavidin conjugated to 1-nm nanogold. The size of the nanogold particle was then enhanced for 2 minutes using a silver-enhancing solution (BBInternational). The silver enhancement was followed by incubation with another primary antibody and a 10 nm-gold-conjugated secondary antibody.

AQ: F

Preparation and Examination of Sarkosyl-Insoluble Material

To investigate for the presence of PHF-like fibrillary material in transgenic mice, we used a protocol previously used to prepare fractions enriched in human PHF insoluble in Sarkosyl.³⁰ Brain tissue was homogenized in 10 mmol/L Tris/HCl, pH 7.4, 0.8 mol/L NaCl, 1 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid, and sucrose 10% (w/v) and centrifuged at $15,000 \times g$ av for 20 minutes. The supernatant was mixed with Sarkosyl (1% w/v final) and centrifuged for 30 minutes at $100,000 \times g$ av. The pellet containing the insoluble material was resuspended in 50 mmol/L Tris/HCl (pH 7.5). This material was adsorbed on Formvar-carbon-coated EM grids and negatively stained with potassium phosphotungstate and immunolabeled as reported³⁰ or analyzed by Western blotting.

Results

Tg30tau Mice Develop a Severe Motor Deficit with Neurogenic Muscle Atrophy and Axonopathy

The Tg30tau transgenic mice developed an ataxic gait and paresis of hindlimbs between 6 and 8 months of age. Dystonic postures were observed at more advanced stages. Tg30tau mice showed a clasping of the limbs rather than an escape posture as wild-type mice on tail elevation (Figure 1, A and B). Tg30tau mice exhibited a high degree of nervousness when tested by Rotarod before 8 months that impeded the significance of this motor testing before 8 months. The Rotarod testing confirmed, however, their progressive motor deficit after 8 months (Figure 1C). A significant difference between wild-type and Tg30tau transgenic mice was already observed at 8 months and dramatically worsened at 10 and 12 months. On dissection, severe muscle atrophy was observed in hindlimbs and extended to axial muscles and forelimbs in aged mice. Tissue samples of the quadriceps femoris showed groups of small angular muscle fibers in the Tg30tau transgenic mice not present in wild-type mice (Figure 1, D and E). The mean cross-sectional area of muscle fibers in 11-month-old animals was significantly smaller in Tg30tau transgenic mice than in wild-type animals (Figure 1F). This severe motor phenotype precluded reliable demonstration of behavioral or cognitive disabilities in the Tg30tau line. This phenotype led to a reduced survival rate in Tg30 mice (Figure 1G), with a median survival of 12 months, whereas most wild-type littermates were still alive at this age.

Numerous myelin ovoids were detected on semithin sections of the sciatic nerve (Figure 2, A and B) in 12-month-old Tg30tau mice and ultrastructural examination showed an axonal degeneration with axonal loss and myelin destruction suggestive of Wallerian degeneration (Figure 2D). Abnormal axonal accumulations of multilamellar bodies and degraded mitochondria were

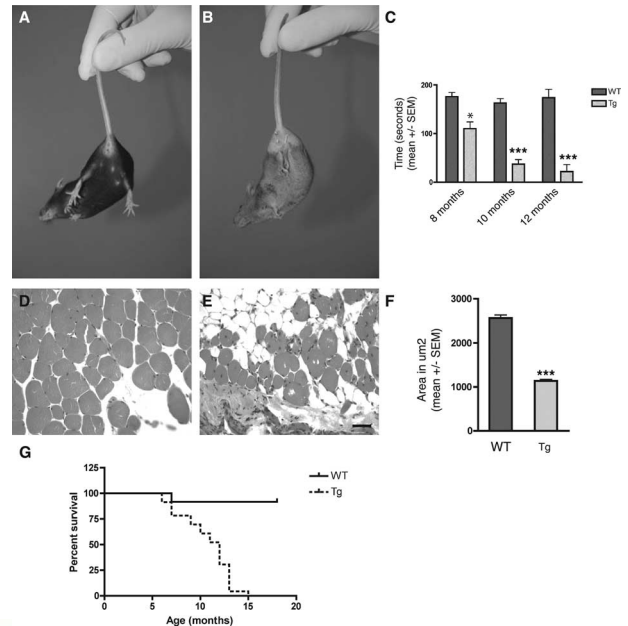


Figure 1. A and B: Tail test showing the abnormal limb-clasping reflex in a 12-month-old Tg30tau transgenic mouse (B) by comparison with an age-matched wild-type mouse (A). C: Rotarod testing of wild-type ($n = 4$ to 8 for each age) and Tg30tau ($n = 7$ to 13 for each age) transgenic mice at different ages. The time spent on the rotating rod by Tg30tau mice is already significantly shorter at 8 months and dramatically decreases at 10 and 12 months (two-way analysis of variance with Bonferroni post test). D and E: Tissue section showing the cross-sectional aspect of muscle fibers in the quadriceps femoris of 12-month-old wild-type (D) and Tg30tau (E) mice. F: There is a severe atrophy of muscle fibers in Tg30tau mice, as indicated by an important reduction in the mean cross-sectional area of muscle fibers in 11-month-old Tg30tau mice ($n = 10$) by comparison with wild-type mice ($n = 4$) (by Student's *t*-test). G: Kaplan-Meier survival curves showing the reduced survival of Tg30tau mice ($P < 0.0001$, by log-rank comparison). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bar = 60 μm .

also observed, already in 3-month-old Tg30 mice (Figure 2C). The number of axons in the sciatic nerve was similar in young wild-type and middle-aged Tg30tau animals but was significantly reduced in 12-month-old Tg30tau (Figure 2E). The axonal mean cross-sectional area increased with aging in wild-type animals but remained almost constant in Tg30tau mice and was significantly smaller at all ages in Tg30tau mice (Figure 2F).

Tg30tau Mice Develop Brain and Hippocampal Atrophy in Absence of Overt Cell Loss

Brain weights were similar in wild-type and in Tg30tau transgenic mice at 3 and 6 months of age. However, a significant reduction in brain weight was observed at 12 months of age in Tg30tau transgenic mice (Figure 3A). The volume of the hippocampal formation was also significantly reduced in 12-month-old Tg30tau mice (Figure 3, B and D). Comparison of the volume of five different layers of the hippocampal formation (stratum radiatum, stratum oriens, pyramidal layer, molecular layer of the gyrus dentatus, and granule cell layer) showed a shrinkage of all layers, but only the volume of the stratum oriens ($P < 0.05$) and of the molecular layer

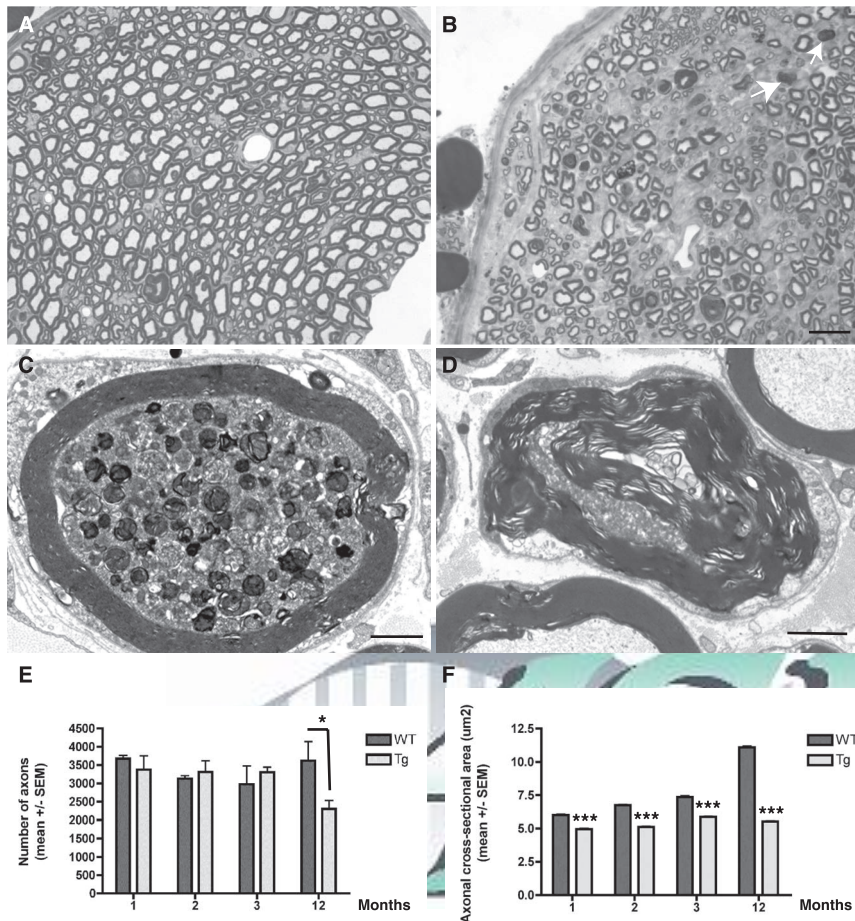


Figure 2. **A** and **B:** Semithin transverse sections of the sciatic nerve of 12-month-old wild-type (**A**) and Tg30tau (**B**) mice. There is a loss of myelinated axons in the Tg30tau mouse, and myelin ovoids are observed (arrows in **B**). **C** and **D:** Ultrastructural section of the sciatic nerve of Tg30tau mice. **C:** An axon shows accumulation of dense and lamellar bodies and degenerating mitochondria in a 3-month-old mouse. **D:** A degenerating axon is surrounded by a myelin sheath showing Wallerian degeneration in a 12-month-old mouse. **E:** The mean number of axonal profiles in transversal sections of the sciatic nerve is similar in young adult wild-type and Tg30tau mice but is significantly decreased in aged Tg30tau mice ($n = 3$ to 5 for wild-type and $n = 3$ to 6 for Tg30tau mice, at each age) (two-way analysis of variance with Bonferroni post test). **F:** The mean cross-sectional area of axons in the sciatic nerve is smaller in Tg30tau mice and increases with age in wild-type but not in Tg30tau mice (same animals as in **E**) (two-way analysis of variance with Bonferroni post test). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Scale bars: 5 μm (**A** and **B**); 1.5 μm (**C** and **D**).

of the gyrus dentatus ($P < 0.05$) were significantly decreased in Tg30 tau mice, suggesting that this volume reduction was more prominent in the dendritic field of granule cells and in the field of basal dendrites of pyramidal cells. The mean height of the primary dendritic shafts (MAP2-positive) was measured in the stratum oriens, in the stratum radiatum, and in the molecular layer of the gyrus dentatus and found to be significantly shorter in the stratum oriens of Tg30tau mice ($P < 0.05$, by Student's t -test) (Supplemental Figure 2, see <http://ajp.amjpathol.org>).

The number of neurons estimated with the optical fractionator method in the pyramidal cell layer of the hippocampus in 12-month-old animals was not found to be statistically different ($P = 0.805$, t -test) between wild-type and Tg30tau transgenic mice (Figure 3E). In the anterior horn of the lumbar spinal cord, the volumetric density of neurons was similar in 12-month-old wild-type and in Tg30 mice (Figure 3F) and was not associated to a change in the volume of spinal gray matter in the investigated level, indicating an absence of cell loss at this level. The TUNEL method detected a few rare positive nuclei in the cortex of 12-month-old transgenic mice but also in wild-type controls, and the anti-activated caspase was detected similarly in a few cells in Tg30tau mice and in wild-type mice.

Accumulation of Gallyas-Positive Inclusions in the Brain and in the Spinal Cord of Tg30tau Mice

The development of argyrophilic tau aggregates was studied with the Gallyas silver-staining method. Gallyas-positive neuronal inclusions in the cortex, the hippocampus, the brainstem, and the spinal cord was examined in 1-, 3-, 6-, and 11-month-old animals (Figure 4). Gallyas-positive neuronal inclusions were absent in 1-month-old Tg30tau mice. A few rare Gallyas-positive neuronal inclusions were detected in the cortex, in the pyramidal layer of the hippocampus and subicular areas (Figure 4A), and more in the gray matter of the spinal cord (Figure 4D) in 3-month-old mice. At 6 months, Gallyas-positive neuronal inclusions were systematically observed in the cortex and in the pyramidal layer of the hippocampus (Figure 4B) and were numerous in the spinal cord (Figure 4E). At 11 months, the numbers of Gallyas-positive neuronal inclusions dramatically increased in the brainstem and the spinal cord (where the majority of neuronal profiles were Gallyas-positive) (Figure 4F) and were frequent in the hippocampus (Figure 4C) and in the cortex. In aged animals, Gallyas-positive inclusions were also detected in deep cerebellar nuclei and in many subcortical nuclei.

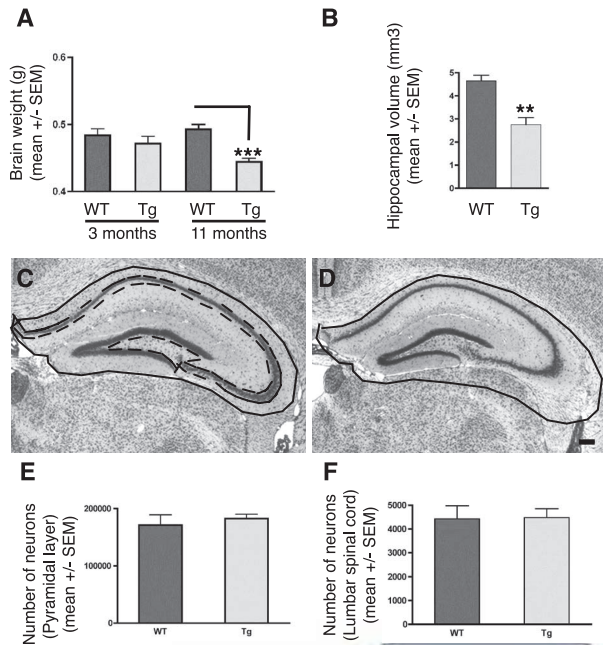


Figure 3. **A:** Brain weights of wild-type ($n = 4$ at 3 and 11 months) and Tg30tau ($n = 4$ at 3 months and $n = 11$ at 11 months) mice. The mean brain weight of Tg30tau mice is significantly decreased at 11 months of age but not at 3 months of age. $***P < 0.001$ (one-way analysis of variance with Bonferroni post test). **B:** Hippocampal volumes of wild-type ($n = 3$) and Tg30tau ($n = 4$) mice at 12 months. The mean volume of the hippocampus is significantly decreased in 12-month-old Tg30tau mice. $**P < 0.01$ (by Student's *t*-test). **C** and **D:** The neuroanatomical limits used for delineation of the hippocampal formation is shown as a solid black line in a wild-type mouse in **C** and is superposed on the hippocampal formation of a Tg30tau mouse in **D** to illustrate the decreased hippocampal area in the latter. The dashed line in **C** represents the limit of the area used to determine cell number in the pyramidal layer (see Figure 12). **E** and **F:** Stereological analysis of cell number in the hippocampal pyramidal cell layer (**E**) and anterior horn of the lumbar spinal cord (**F**) of 12-month-old wild-type ($n = 3$) and Tg30tau ($n = 3$) mice. Total neuron numbers in the pyramidal layer of the hippocampus (**E**) and neuron numbers in the anterior horn of a limited segment of the lumbar spinal cord (**F**) of wild-type and Tg30tau mice were not different. Scale bar = 150 μm .

After Congo Red staining, a few of these fibrillary inclusions in the brain, but not in the spinal cord, showed a birefringence under crossed polarization filters and were thioflavin-positive.

Transgenic Human Tau Proteins Are Detected in Neurons in the Brain and Spinal Cord of Tg30tau Mice and Show Sequential Changes in Tau Phosphorylation, Conformation, and Solubility

The transgenic tau protein was expressed only in brain and spinal cord of Tg30tau mice and not in nonneuronal tissues (Figure 5A). The human tau protein, already detected at 18 days postnatally in transgenic mice, was expressed in cortical areas, in subcortical nuclei, in the brainstem, and in the spinal cord (Figure 5B). Numerous positive neurons with a somatodendritic labeling were detected in these areas, eg, in the hippocampus (Figure 5D) and in the spinal cord (Figure 5E). Many axonal tracts (eg, the corpus callosum, the mossy fibers, and the fimbria in the hippocampus) were also labeled. The trans-

genic tau protein was also detected in axons of the sciatic nerve (Figure 5F). Glial cells were not labeled.

We used a panel of tau antibodies to detect changes in tau phosphorylation and conformation in Tg30tau mice at different ages (18 days postnatally; 1, 3, 6, and 12 months old) (Table 1). Neurons with a positive somatodendritic labeling with AT180 and AT270 antibodies were detected as early as 18 days postnatally in the cortex and in the hippocampus and at 3 months in the spinal cord. MC1-, AP422-, and PHF-1-positive neurons were detected in spinal cord at 1 month and at 3 months in hippocampus. AT8-, pSer262-, and AT100-positive neurons were observed at 3 months both in the spinal cord and in the hippocampus and were concomitant with the appearance of Gallyas-positive neurons. We examined the development of somatodendritic accumulation of phosphotau with the AT8 antibody in 3-, 6-, and 11-month-old Tg30tau mice (Figure 6). The general pattern of evolution was similar as that observed with the Gallyas staining. In 3-month-old mice, rare AT8-positive neurons were detected in the cortex, in the pyramidal layer of the hippocampus and subicular areas (Figure 6A), and more in the gray matter of the spinal cord (Figure 6D). At 6 months, AT8-positive neurons were systematically observed in the cortex and in the pyramidal layer of the hippocampus (Figure 6B) and were numerous in the spinal cord (Figure 6E). At 11 months, the number of AT8-positive neurons dramatically increased in the spinal cord (Figure 6F) and these neurons were frequent in the hippocampus (Figure 6C) and in the cortex. Neurons with a positive somatodendritic labeling with all these tau antibodies were detected in 12-month-old Tg30tau mice (Figure 7, B–E) and also with anti-tau antibodies pThr212, pSer214, pThr403, and pSer409 (not shown) and were never observed in age-matched wild-type controls. Although most Gallyas-positive neurons were phosphotau-positive, neurons with a somatodendritic phosphotau labeling (eg, AT8) and those that were Gallyas-negative were also detected (Figure 13, C and E).

The antibodies to the N and C termini of human tau detected the early somatodendritic accumulation of human tau (Table 1) and also the initial neuronal fibrillary inclusions, suggesting that the whole human tau molecule is integrated into abnormal filaments. Neurons positively labeled with the anti-truncated tau (Asp421) were systematically observed only in 12-month-old Tg30tau mice (Figure 7G). The 4G10 and PT-66 phosphotyrosine antibodies strongly labeled fibrillary inclusions already in 3-month-old and older Tg30tau transgenic mice (Figure 7F). Double immunolabeling with the 4G10 and phosphotau antibodies showed a co-localization of the two immunoreactivities (not shown). Neurons positively labeled with the anti-ubiquitin antibodies were observed at 3 months and later (Figure 7H). The immunolabeling with the anti-GFAP antibody showed a slight increase in fibrillary astrocytes in the cortical areas and the hippocampus, more pronounced in the spinal cord. Microglial cells detected with the RCA lectin were not more abundant in transgenic mice than in wild-type littermates.

The Western blot analysis of homogenates of brain and spinal cord of Tg30tau and wild-type mice with tau anti-

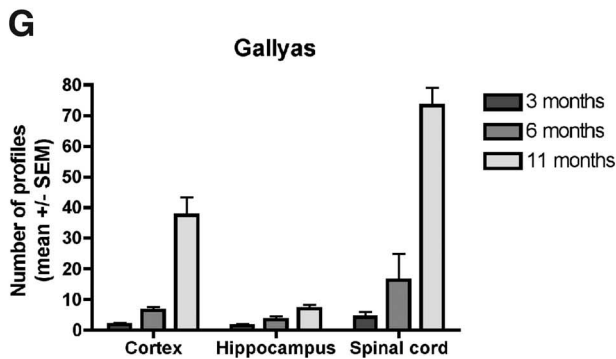
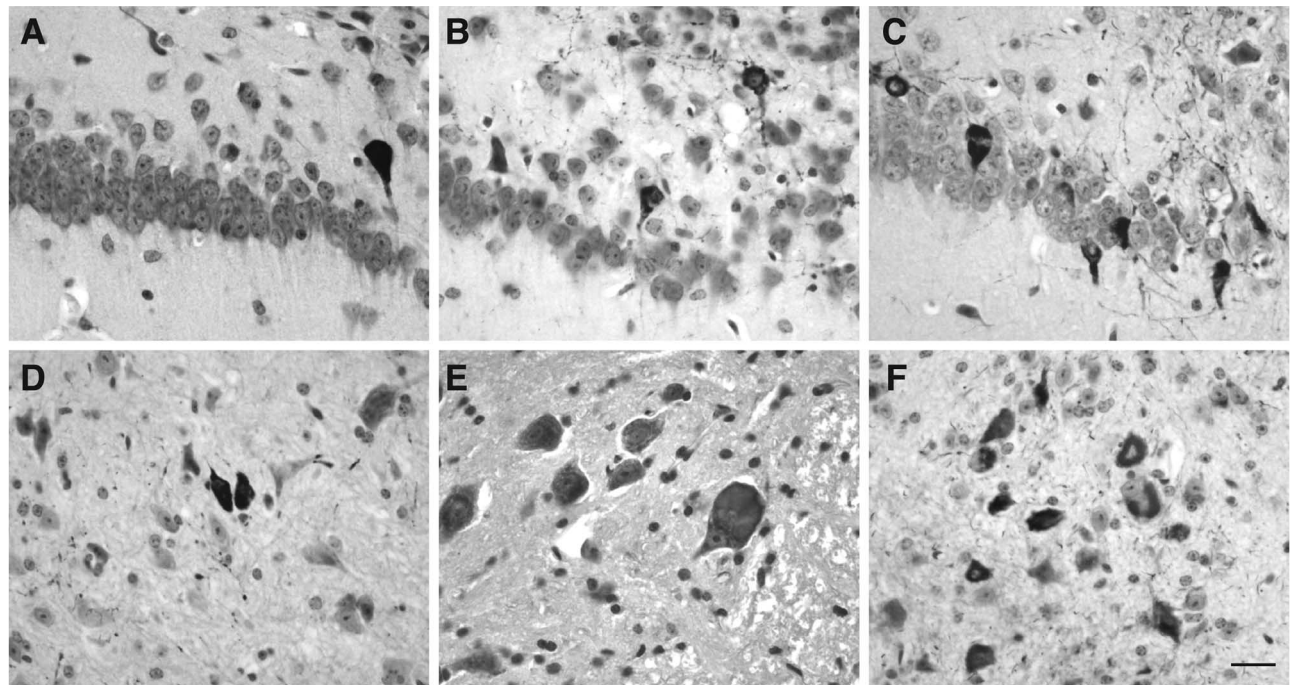


Figure 4. A–F: Gallyas silver staining on tissue section of the hippocampus and subiculum (A–C) and the spinal cord (D–F) of Tg30tau mice. **A–C:** Gallyas-positive neuronal inclusions are detected in the pyramidal layer and the subiculum in 3-month-old Tg30tau mice (A) and increase in number in 6-month-old (B) and 12-month-old (C) mice. **D–F:** Gallyas-positive neuronal inclusions are detected in neurons in the anterior horn of the spinal cord in 3-month-old Tg30tau mice (D) and increase in number in 6-month-old (E) and 12-month-old (F) mice. **G:** Quantification of Gallyas-positive neuronal inclusions in cortex, hippocampal pyramidal layer, and lumbar gray matter of the spinal cord in 3-month-old ($n = 6$), 6-month-old ($n = 5$), and 12-month-old ($n = 10$) Tg30tau mice, expressed as the mean number of Gallyas-positive profiles per tissue section. Scale bar = 15 μ m.

bodies was performed at 3, 6, and 12 months of age (Figure 8). Tau species of 64- and 69-kd were detected with the human-specific tau antibody in brain and spinal cord at all ages in Tg30tau mice (Figure 8A), with the 69-kd species being more abundant in aged Tg30tau mice. These tau species were detected in Tg30tau mice already at 3 months with the phosphotau antibodies AD2 and AT100 (Figure 8, C and D) and at 6 months with the AT8 antibody (Figure 8B). The phosphotau antibodies AT180 and AT270 also detected these tau species at 3 months in Tg30tau mice (Supplemental Figure 3, see <http://ajp.amjpathol.org>).

Sarkosyl-insoluble material from the brain and the spinal cord was analyzed by Western blotting and examined by electron microscopy. In Tg30tau mice but not in wild-type controls, these preparations contained both 64- and 69-kd species immunoreactive with human-specific and phosphotau antibodies (Figure 9, A and B). In Tg30tau mice this material contained straight filaments or filaments with periodic constrictions. These filaments were immunolabeled with the human-specific TP20 tau antibody (Figure 9, C and D) and with the phosphotau AT8 antibody (Figure 9, E and F).

Spinal Cord but Not Hippocampal Fibrillary Inclusions Contain Neurofilaments

At the ultrastructural level, fibrillary large cytoplasmic inclusions were regularly detected in pyramidal neurons (Figure 10A) and in motorneurons in the spinal cord (Figure 10D). At higher magnification, the inclusions in the hippocampus were observed to be composed of bundles of parallel or swirling filaments that were often admixed with mitochondria (Figure 10B). Most of these filaments were straight or wavy (Figure 10C); measurement of their diameter on cross-sections gave values of 19.1 ± 0.2 nm (mean \pm SEM, $n = 50$). For comparison, measurement of the diameter of adjacent microtubules in axons in the same transgenic animals gave values of 29.15 ± 0.3 nm (mean \pm SEM, $n = 36$). Less often, filaments with regular constrictions were also encountered (Figure 10C); these PHF-like filaments had a larger diameter (35 nm) and regular constrictions (every 100 nm). Occasionally, continuity between the straight and PHF-like types of filaments was observed. The fibrillary inclusions in spinal cord motorneurons (Figure 10D) con-

F8

F9

F10

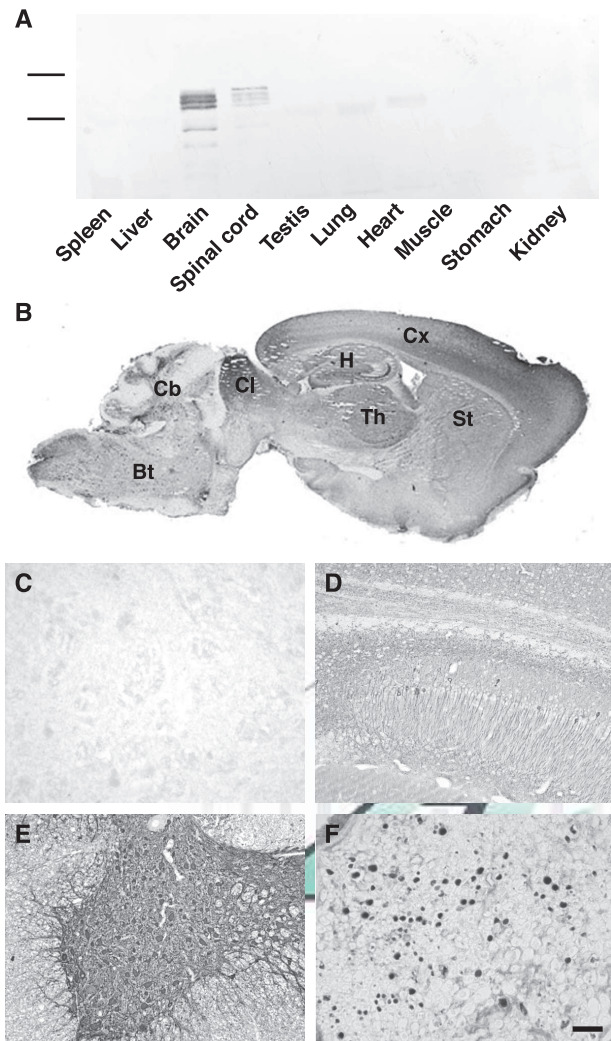


Figure 5. A: Western blotting analysis of the expression of the human tau transgenic protein in different organs of Tg30 mice with a human-specific antibody to tau. This expression is limited to brain and spinal cord. **B–F:** Immunocytochemical labeling with the human-specific antibody to tau. **B:** Low-magnification sagittal section of the brain of a 6-month-old Tg30tau mouse showing widespread expression of human tau in cortex (Cx), hippocampus (H), striatum (St), thalamus (Th), colliculus (CL), cerebellum (Cb), and brainstem (Bt). **C–F:** Higher magnification showing the strong expression of human tau in the pyramidal layer of the hippocampus (**D**), in the gray matter of the spinal cord (**E**), in the sciatic nerve (**F**), and its absence in the spinal cord of a wild-type mouse (**C**). Scale bar = 40 μ m.

tained bundles of swirling thin 10-nm-wide filaments, sometimes admixed with the above-described 20-nm straight filaments (Figure 10F). These fibrillar inclusions tended to be relatively devoid of cytoplasmic organelles, eg, displacing them at the periphery of the cell body (Figure 10E).

In aged Tg30tau mice, most neurons with tau- and Gallyas-positive inclusions in the cortex and the hippocampus were not labeled by anti-NF antibodies (Figure 11, A and B). However, most neurons in the spinal cord and many neurons in brainstem nuclei contained inclusions immunolabeled with antibodies to tau and to phosphorylated and unphosphorylated NF-L, NF-M, and NF-H (Figure 11, C and D), already in 1-month-old Tg30tau mice (Table 1). Many neurons in the spinal

cord had swollen cytoplasm and peripheral nuclei, consistent with chromatolytic features. Inclusions in spinal cord neurons were also Gallyas-positive at 3 months. The immunolabeling in electron microscopy indicated the presence of both tau and neurofilament immunoreactivities on separate filaments in the spinal cord inclusions (Figure 11E).

Axonal Dilatations and Spheroids Develop Early in the Cortex, Brainstem, and Spinal Cord of Tg30 Tau Mice

In addition to neurofilament-positive perikaryal inclusions, we detected frequent neurofilament-positive axonal dilatations and spheroids in the spinal cord (Figure 12C), in the brainstem (Figure 12D), in the cortex (Figure 12E), and more occasionally in the hippocampus. Spheroids were not present in 15-day-old Tg30tau mice but were detected in 1-month-old Tg30 tau mice and not in wild-type mice (Figure 12, A and B) before appearance of Gallyas-positive inclusions. These axonal spheroids were thus early lesions appearing before most tau phosphorylation changes, tau aggregation, and motor deficits (a timeline showing these events is presented in Supplemental Figure 1, see <http://ajp.amipathol.org>).

Ultrastructural observations also identified spheroids that contained accumulations of membranous organelles (mitochondria, reticulum) and of microtubules and neurofilaments (Figure 12, F and G), indicative of impairment of axoplasmic transports. Abnormal multilamellar bodies and multivesicular bodies were frequently seen in these spheroids. Neuritic dilatations containing thick bundles of abnormal filaments often showed adjacent accumulations of normal and degraded organelles (Figure 12H), also suggestive of deficits of axoplasmic transports.

Protein Kinases GSK-3 β and JNK Accumulate in Hippocampal Inclusions and ERK1 in Spinal Cord Inclusions

In view of the accumulation of phosphorylated tau in neurons, we investigated for potential changes in kinases/phosphatases distribution or expression in the brain of Tg30tau mice, using a panel of antibodies to selected kinases and phosphatases. In 6-month-old mice, we detected isolated neurons in the cortex and in the hippocampus with strong somatodendritic immunoreactivity for the active forms of GSK-3 β (pY216) and of Jun kinase (Figure 13, A and B). Similar neurons were not detected with antibodies to kinases cdk5, p35, ERK1, casein kinase Id, or cdc2 and were not present in wild-type littermates. Double-immunolabeling with phospho-tau (AT8) and GSK-3 β pY216 antibodies followed by Gallyas staining indicated that, among neurons showing an AT8 immunoreactivity at 6 months, the majority were also GSK-3 β -positive (Figure 13, C and D) and Gallyas-positive (Figure 13E). Some AT8- and GSK-3 β -positive neurons were however Gallyas-negative, suggesting that accumulation of phosphotau and GSK-3 might precede

Table 1. Somatodendritic Immunoreactivity in Hippocampus and Spinal Cord of Tg30tau Mice

Antibody	Epitope	Somatodendritic IR					
		1 month		3 months		12 months	
		H	SC	H	SC	H	SC
B19*	Whole tau	+	+	+	+	+	+
TP20*	32-1	+	+	+	+	+	+
TP007*	1-6	+	+	+	+	+	+
TP70*	428-441	+	+	+	+	+	+
Asp421*	Tau cleaved at Asp421	-	-	-	-	+	+
AT270	Thr181 (P)	+	-	+	+	+	+
AT180	Thr231 (P)	+	-	+	+	+	+
PHF-1	Ser396/404 (P)	-	+	+	+	+	+
AP422	Ser422 (P)	-	+	+	+	+	+
MC1	7-9 and 312-342**	-	+	+	+	+	+
pSer262	Ser262 (P)	-	-	+	+	+	+
AT8	Ser202/Thr205 (P)	-	-	+	+	+	+
AT100	Thr212/Ser214***	-	-	+	+	+	+
4G10	Tyr (P)	-	-	+	+	+	+
Ubiquitin	ND	-	+	+	+	+	+
NA1214	NF-L	-	+	-	+	-	+
NA1216	NF-M	-	+	-	+	-	+
NA1211	NF-H (P)	-	+	-	+	-	+
Gallyas staining		-	-	+	+	+	+

The immunoreactivity was studied with phosphorylation-independent antibodies (*), antibodies requiring a phosphorylated epitope (P), a conformational epitope (**), or a conformational and phosphorylated epitope (***). The numbers refer to the position of amino acids in the longest human tau isoform. H, hippocampus; SC, spinal cord; +, present; -, absent. Gallyas silver staining was used to identify somatodendritic fibrillar aggregates.

tau filament assembly. Neurons in spinal cord were also slightly GSK-3 β -positive but most were strongly positive with the anti-ERK1 antibody (Figure 11F).

ease such as FTD with motor signs³ and the Guam-parkinsonism-amyotrophic lateral sclerosis-dementia complex.⁴⁸

Discussion

A Transgenic Model for Tauopathies with Widespread Neurofibrillary Pathology and a Severe Motor Phenotype

In this study, we report the characterization of a new transgenic model expressing two pathogenic tau mutations identified in familial forms of FTD. P301S²³ and G272V⁴⁶ tau proteins have a reduced ability to promote microtubule assembly, and both mutations accelerate the formation of tau filaments *in vitro*.⁴⁷ The Tg30tau mice expressing this mutant tau developed NFTs both in the forebrain and in the spinal cord, as well as brain and hippocampal atrophy, axonopathy with neurogenic muscle atrophy and exhibited a reduced survival. These features were not observed in the previous transgenic line expressing the G272V mutation in a different tau isoform (2N4R) under a different promoter system (tetracycline-dependent transactivator system) and developing rather oligodendroglial fibrillary lesions.¹³ Motor symptoms and NFTs developed in a transgenic line expressing the P301S mutation also in a different tau isoform (0N4R) but were observed in homozygous animals.¹⁷ NFTs also developed in a recently described P301S transgenic tau line.¹⁸ The motor and pathological phenotype of Tg30tau mice thus provides an adequate model for studying tauopathies in which brain and spinal cord NFT pathology is associated with a motor neuron dis-

Different Neurofibrillary Lesions Develop in Forebrain and in Spinal Cord of Tg30tau Mice

Neurofibrillary lesions in brain and in spinal cord shared common features but also had distinct characteristics. Biochemical analysis showed the progressive accumulation of a phosphorylated 69-kd tau species in brain and spinal cord homogenates and in Sarkosyl-insoluble material. The sequence of early tau phosphorylation changes in the somatodendritic tau was different in forebrain and spinal cord: phosphorylated tau epitopes at Ser396/404 (PHF1), Ser422 (AP422), and a conformational tau epitope (MC1) appeared first in the spinal cord, whereas phosphorylated tau epitopes at Thr181 (AT270) and Thr231 (AT180) appeared first in forebrain, compatible with transgenic tau being initially a substrate for different protein kinases or combinations of protein kinases in these different neuronal populations. Phosphorylated tau epitopes at Ser202/Thr205 (AT8) and Ser262 (pSer262) and a phosphorylated/conformational tau epitope at Thr212/Ser214 (AT100) appeared later, in both the forebrain and the spinal cord. The first appearance of Gallyas-positive NFTs was concomitant of the latter phosphorylation events, suggesting that they either contribute to the aggregation process or indicate changes in kinase activities or in tau availability as a substrate for these kinases. Neurons at pretangle stage, phosphotau-positive and Gallyas-negative, were also present at all ages. In the brain and the spinal cord, many neurons containing NFTs were labeled with antibodies to active GSK-3 β and JNK suggesting that these protein kinases

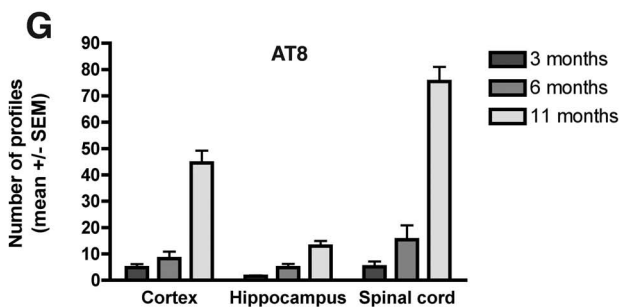
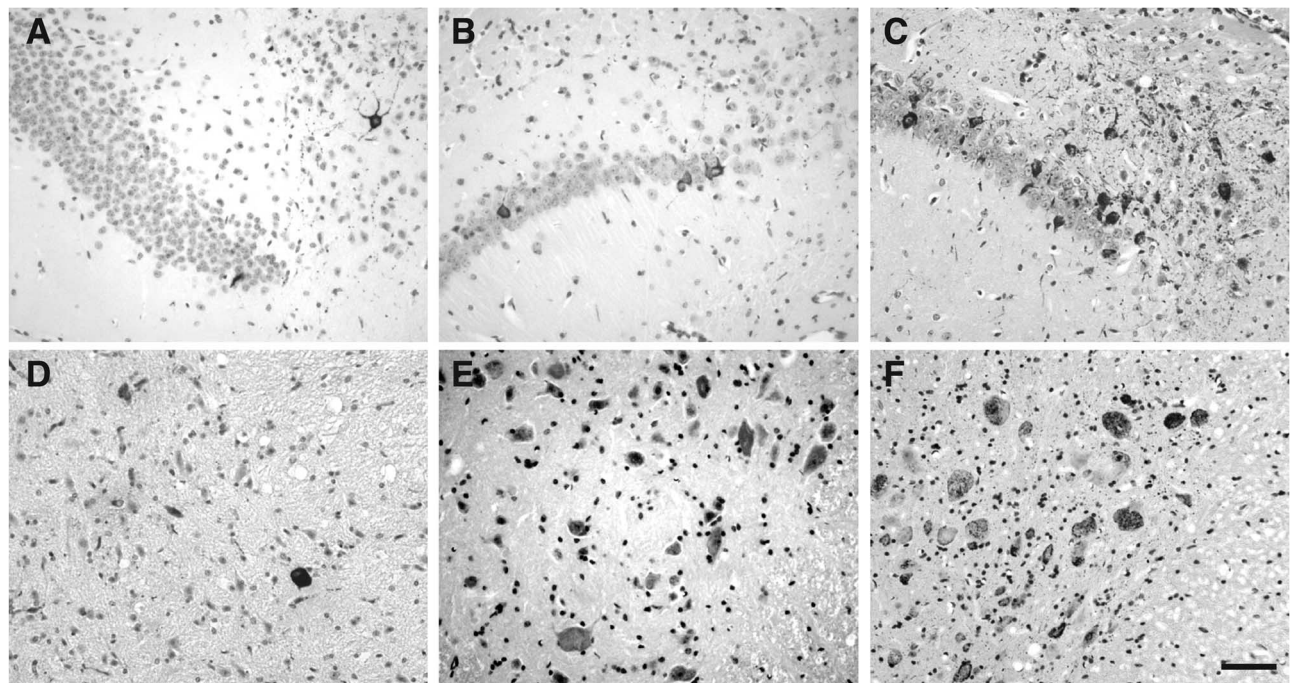


Figure 6. A–F: AT8 immunolabeling on tissue section of the hippocampus and subiculum (**A–C**) and the spinal cord (**D–F**) of Tg30tau mice. Neurons with an AT8-positive somatodendritic labeling are detected in the pyramidal layer and the subiculum and in the spinal cord in 3-month-old Tg30tau mice (**A** and **D**) and increase in number in 6-month-old (**B** and **E**) and 12-month-old (**C** and **F**) mice. **G:** Quantification of AT8-positive neurons in cortex, hippocampal pyramidal layer, and lumbar gray matter of the spinal cord in 3-month-old ($n = 6$), 6-month-old ($n = 5$), and 12-month-old ($n = 10$) Tg30tau mice, expressed as the mean number of AT8-positive profiles per tissue section. Scale bar = 20 μm .

might be instrumental in generating at least some of the phosphotau epitopes identified in NFTs in Tg30tau mice. The association of GSK-3 β with NFTs has been previously reported in AD^{49,50} and in a P301L mutant tau transgenic line.⁵¹ JNK phosphorylates tau *in vitro*⁵² and was found associated to NFTs in a P301S mutant tau transgenic line.¹⁷

The NFTs were labeled with anti-tau antibodies specific for epitopes localized in the extreme N- and C-terminal domains of tau proteins, indicating that whole tau proteins were included in these inclusions. A labeling of NFTs with the antibody to truncated tau was observed only in more aged animals, suggesting that this proteolytic event is not a prerequisite for tau filament formation in Tg30tau line. This tau truncation has been reported to result from a caspase cleavage induced by extracellular A β and preceding apoptosis,⁵³ but we did not detect significant numbers of positive cells for active caspase nor apoptotic cells, and extracellular A β amyloid deposits were absent in Tg30tau mice.

In agreement with another study,⁵⁴ we detected phosphotyrosine immunoreactivity in NFTs, suggesting that the mutant tau protein was phosphorylated on tyrosine amino acid residues. Tyrosine phosphorylation of tau has been reported in AD brain,^{55,56} and A β was found to induce tyrosine phosphorylation of tau,⁵⁷ but the present

finding indicates that tyrosine phosphorylation of tau can also occur in the absence of A β .

Most NFTs in the forebrain were composed of both abundant straight or ribbon-like filaments and wider PHF-like filaments. Consistent with these observations, straight filaments have been reported in an FTD family with the P301S mutation,²³ and twisted filaments were observed in Pick's bodies of a family with hereditary Pick's disease with the G272V mutation.⁵⁸ In contrast, NFTs in spinal motorneurons contained a mixture of neurofilaments and abnormal tau-positive filaments and exhibited features of ballooned neurons. ERK1 immunoreactivity was also detected in NFTs in spinal cord but not in forebrain. ERK1 has been shown to phosphorylate neurofilament polypeptides⁵⁹ and might be responsible for the additional detection of phosphorylated neurofilament epitopes in these inclusions. Ballooned neurons have been found in human tauopathies and have been observed in a transgenic mouse line expressing mutant P301L human tau.⁶⁰ In the latter study, neurofilaments were also observed in these neurons by ultrastructural observation. Thus, expression of this double-mutant tau resulted in Tg30tau mice in contrasting differences in initial patterns of tau phosphorylation and later in recruitment or not of neurofilaments in tau-positive fibrillary inclusion in different neuronal populations.

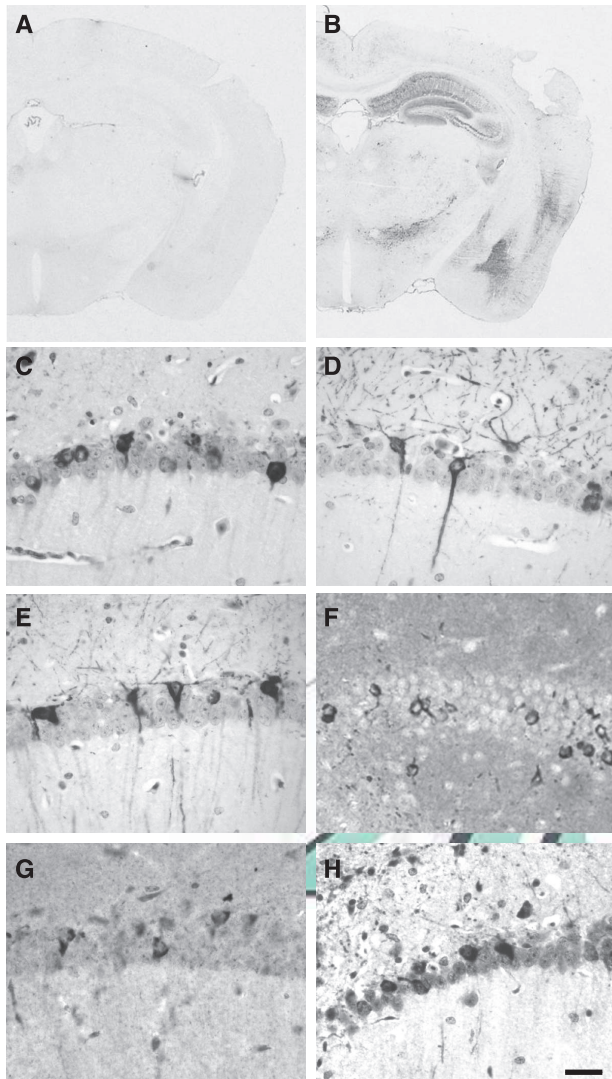


Figure 7. Immunocytochemical labeling with tau antibodies in 12-month-old Tg30tau mice. **A** and **B**: Low magnification showing the immunolabeling with the phospho-dependent tau antibody AT8 on a coronal section of a wild-type (**A**) and a Tg30tau (**B**) mouse. Note the strong AT8 labeling in the hippocampus and in the temporal cortex. **C–H**: Immunolabeling of NFTs on tissue section of the pyramidal layer of the hippocampus with the phospho-dependent tau antibodies AT180 (**C**) and PHF-1 (**D**), the conformation-dependent tau antibody MC1 (**E**), the phosphotyrosine 4G10 antibody (**F**), the anti-cleaved tau (Asp421) antibody (**G**), and the anti-ubiquitin antibody (**H**). Scale bar = 50 μ m.

Axonal Atrophy, Axonal Loss, and Spheroids as Evidence of Early Disturbances of Axoplasmic Transports

As reported previously,⁶¹ we observed an age-dependent increase in the cross-sectional area of myelinated axons in the sciatic nerve of wild-type mice; the mean axonal cross-sectional area remained, however, relatively constant in Tg30tau mice, suggesting that mutant tau expression in Tg30tau mice interfered early with this axonal growth. The number of myelinated axons in the sciatic nerve was also reduced in aged Tg30tau mice, most probably explaining the neurogenic muscular atro-

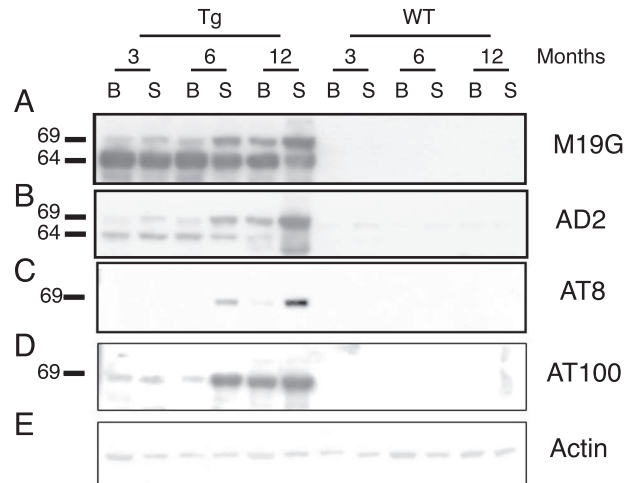


Figure 8. Western blot analysis of homogenates of brain (B) and spinal cord (S) of Tg30tau and wild-type mice at 3, 6, and 12 months of age. Equivalent protein yields (100 μ g) were loaded in each lane. **A**: M19G human-specific tau antibody. The human transgenic tau protein is present at all ages in Tg30 mice (and not in wild-type) as a 64-kd species but a slower migrating species of 69 kd is also detected at low level at 3 months and at higher level in 6- and 12-month-old Tg30tau mice. **B**: AD2 phosphotau antibody. The antibody detects both the 64- and the 69-kd species in Tg30tau mice, already at 3 months. **C**: AT8 phosphotau antibody. The antibody detects only the 69-kd species, a strong signal being first seen at 6 months in the spinal cord. **D**: AT100 conformation-dependent phosphotau antibody. The antibody detects only the 69-kd species, already at 3 months and in both the brain and the spinal cord. **E**: Actin antibody, used as a control for protein loading. The numbers on the left refers to the positions of PHF-tau proteins of 69 and 64 kd.

phy observed in these animals. The axonal atrophy and loss were not associated with a significant change in neuronal density in the anterior horn of the spinal cord, suggesting that axons had degenerated in a number of these neurons but that their cell bodies were still present. This hypothesis is supported by the accumulation of phosphorylated neurofilaments in perikarya of spinal cord motor neurons in Tg30tau mice, an event known to be associated with a variety of axonal insults, including axonal transection^{62,63} and several neurodegenerative diseases,⁶⁴ such as classic amyotrophic lateral sclerosis,⁶⁵ Guam amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex⁴⁸ and transgenic models.⁶⁶

Axonal spheroids were numerous in Tg30tau mice and appeared even earlier than NFTs. An axonopathy with spheroids was observed in tau transgenic lines expressing wild-type tau,^{9–11,67} but in the absence of NFTs. In agreement with our study, spheroids were also observed to occur early in a transgenic mouse strain expressing a wild-type 2N4R tau isoform and before NFTs when comparing the latter strain with a strain with an identical genetic background and expressing a mutant 2N4R tau isoform.⁶⁷ Spheroids differ, however, from the perikaryal inclusions in neurons of the spinal cord in Tg30tau mice because the latter are composed of a mixture of neurofilaments and abnormal tau-positive filaments. An axonopathy was also observed in some¹⁴ but not all,^{15,67} mutant tau transgenic lines developing NFTs in the spinal cord, but these NFTs were not neurofilament-positive, as in Tg30tau mice. Interestingly, cross-breeding of mice

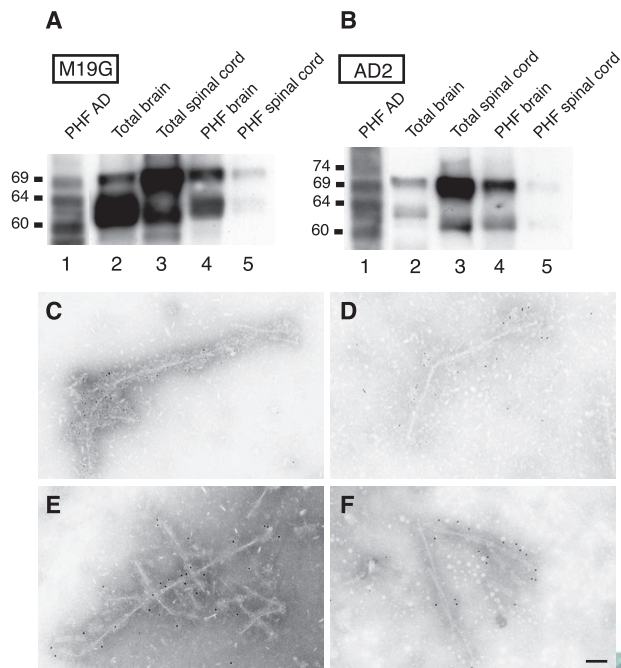


Figure 9. A and B: Western blot analysis with the human-specific antibody M19G (**A**) and the phospho-dependent tau antibody AD2 (**B**) of Sarkosyl-insoluble fractions from human AD brain (**lanes 1**), brain homogenates (**lanes 2**), spinal cord homogenates (**lanes 3**), and Sarkosyl-insoluble fractions from brain (**lanes 4**) and spinal cord (**lanes 5**) of 12-month-old Tg30tau mice. The 69- and a 64-kD species are detected in homogenates and Sarkosyl-insoluble fractions with both antibodies in Tg30tau mice, but the 69-kD species is more intensely immunoreactive than the 64-kD species with the AD2 antibody. Equivalent protein yields (100 μ g) were loaded in **lanes 2** and **3**; similar volumes of resuspended Sarkosyl-insoluble material were loaded in **lanes 4** and **5**, but this material was obtained starting with 10 times more tissue weight for the brain by comparison with spinal cord. **C–F:** Immunogold labeling in electron microscopy of abnormal filaments present in the Sarkosyl fractions prepared from brain (**C** and **E**) and spinal cord (**D** and **F**) of Tg30tau mice. Filaments are labeled by the human-specific tau antibody TP20 (**C** and **D**) and the phospho-dependent tau antibody AT8 (**E** and **F**). Scale bar = 25 nm.

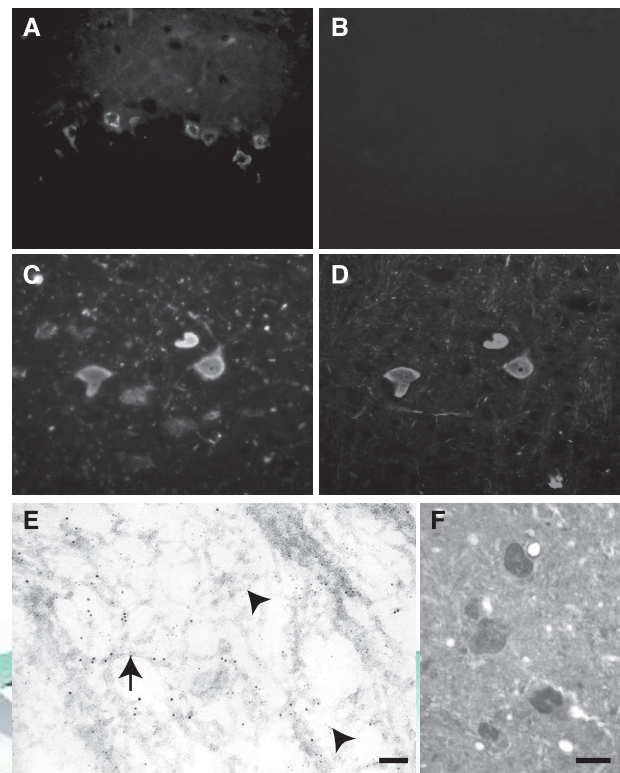


Figure 10. Ultrastructural aspects of fibrillary inclusions in the hippocampus (**A–C**) and in the spinal cord (**D–F**) of Tg30tau mice. **A:** A pyramidal neuron in the Ammon's horn contains numerous fibrillary inclusions in its cytoplasm. **B:** Higher magnification of the rectangular area delimited in **A**. Bundles of filaments are admixed with mitochondria. **C:** High magnification of a fibrillary inclusion composed of both straight filaments (**arrowhead**) and twisted filaments (**arrow**). **D:** A neuron in the anterior horn of the spinal cord contains a massive cytoplasmic inclusion. Organelles tend to be displaced in the center or at the periphery of the cytoplasm. **E:** Higher magnification showing the fibrillary aspect of the inclusion in a motor neuron and the peripheral position of mitochondria. **F:** High magnification of a motor neuron inclusion, showing the presence of both 20-nm straight filaments (**arrow**) and thin 10-nm filaments (**arrowhead**). Scale bars: 1 μ m (**A** and **D**); 100 nm (**B**, **E**, and **F**); 300 nm (**C**).

overexpressing wild-type tau with knockout mice devoid of one neurofilament polypeptide resulted in mice with reduced spheroid numbers and improved motor phenotype.⁶⁸ It seems thus possible that in Tg30tau mice the unique increased aggregating ability of the mutant tau (or any other toxic function) was further enhanced by direct or indirect interaction with neurofilaments and led to the development of a severe axonopathy and massive intraneuronal inclusions in spinal cord motor neurons. In addition to a functional defect of mutant tau (eg, on microtubule stability), it is possible that overexpression of tau per se plays also a role in development of the axonopathy. Segregation of cytoplasmic organelles by inclusions in spinal motor neurons, axonal spheroids, and accumulation of neurofilaments are all indicative of disturbances of axonal transport that would be the primary mechanism leading to early deficits in axonal growth and to later axonal degeneration in Tg30tau mice. Disturbance of axonal transports is thought to be a pathogenic mechanism in a variety of neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis⁶⁵ and early stages of

AD.⁶⁹ Additional early pathologies might also play a role in disease onset, eg, synapse loss as reported recently in a mutant tau model.¹⁸

Neurofibrillary Lesions and Hippocampal Atrophy Develop without Overt Neuronal Loss

Despite the presence of NFTs in the pyramidal layer, we did not observe a decrease in cell number in the same layer up to 12 months in Tg30tau mice. This result is consistent with a recent study in a reversible tau transgenic model indicating that existence of NFTs alone does not necessarily cause neuronal death in the forebrain.^{16,22} However, Tg30tau mice developed age-dependent brain and hippocampal atrophy, and hippocampal atrophy was more marked in some dendritic fields, suggestive of shrinkage of dendritic arborization, in absence of marked cell loss. Numerous neurons with somatodendritic phosphorylated tau, outnumbering the number of NFTs, were observed in the hippocampi of

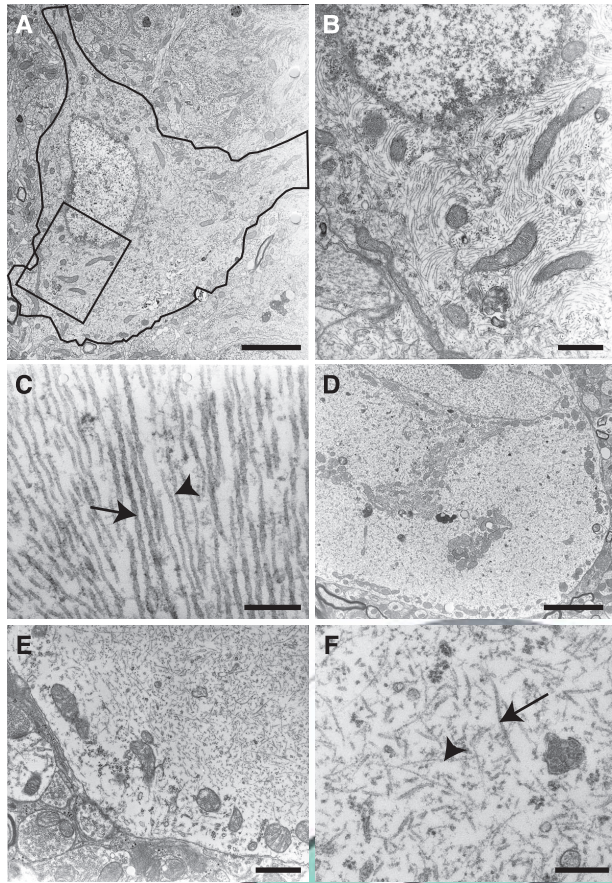


Figure 11. A–D: Double immunolabeling on tissue sections of the pyramidal layer of the hippocampus (**A** and **B**) and the anterior horn of the spinal cord (**C** and **D**) with the AT8 antibody (**A** and **C**) and the anti-neurofilament M antibody (**B** and **D**). The somatodendritic accumulation of phosphotau is associated to a neurofilament accumulation in motoneurons in the spinal cord but not in the pyramidal neurons in the hippocampus. **E:** Double immunogold labeling in electron microscopy (ultrathin section) of filaments present in a cytoplasmic inclusion in a spinal cord motor neuron with the AT8 (10-nm gold particles, **arrows**) and the anti-neurofilament M (5-nm gold particles, **arrowheads**) antibodies. **F:** Immunolabeling of cytoplasmic inclusions in spinal cord motorneurons with the anti-ERK1 antibody. Scale bars: 20 μm (**A–D**, **F**); 120 nm (**E**).

Tg30 mice, and this high level of phosphorylated tau might be responsible for these neurodegenerative features. Aberrant tau phosphorylation, in the absence of NFT formation, is associated with tau-induced neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*,⁷⁰ *Drosophila*,⁷¹ and presenilin knockout mice.⁷² Our data support the hypothesis that expression and phosphorylation of this mutant tau per se can exert deleterious effects on neuronal function without overt neuronal loss. However, this does not exclude the possibility that NFTs might have additional biological effects, eg, on axoplasmic flows. A similar conclusion can be drawn for NFTs in spinal cord: the axonal loss and atrophy in peripheral nerves demonstrates neuronal dysfunction, in the absence of overt changes in neuronal density despite impressive development of fibrillary inclusions. The Tg30tau mice thus provide an interesting model to investigate the relationship between tau fibrillary pathology, disturbances of axonal transport, cell death, and the selective vulnerability of

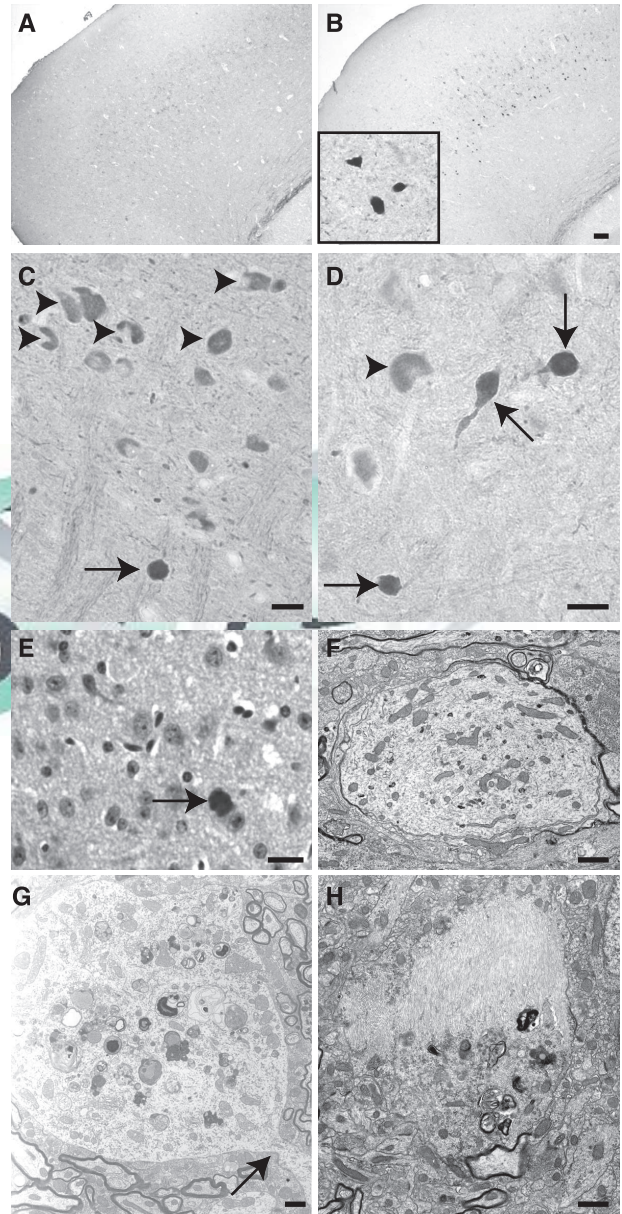


Figure 12. A–E: Anti-neurofilament labeling in 1-month-old (**A** and **B**) and 12-month-old (**C–E**) Tg30tau mice. **A** and **B:** Cortex. Neurofilament-positive spheroids are present in cortical layers of Tg30tau mice (**B** and **inset** in **B**) but not in wild-type mice (**A**). **C:** Spinal cord. Numerous neurons in the anterior horn show neurofilament-positive cytoplasmic inclusions (**arrowheads**). An axonal spheroid is also labeled (**arrow**). **D:** Brainstem. Three labeled spheroids continuous with small processes (**arrows**) are adjacent to a neuron with a positive cytoplasmic inclusion (**arrowhead**). **E:** Cortex. A labeled spheroid is identified (**arrow**). **F–H:** Ultrastructural aspects of axonal dilations in Tg30tau mice. **F:** Hippocampal pyramidal layer. An axonal dilatation with an atrophic myelin sheath contains a disordered accumulation of mitochondria, membranous profiles, microtubules, and neurofilaments. **G:** Spinal cord. A marked neuritic dilatation contains accumulations of abnormal mitochondria, multilamellar and dense bodies, and Golgi stacks. The dilatation has a neck continuous with a process (**arrow**). **H:** Hippocampal pyramidal layer. A process contains a thick bundle of abnormal filaments adjacent to an abrupt accumulation of lamellar and dense bodies. Scale bars: 40 μm (**A** and **B**); 20 μm (**C** and **D**); 15 μm (**E**); 1.5 μm (**F** and **H**); 2.5 μm (**G**).

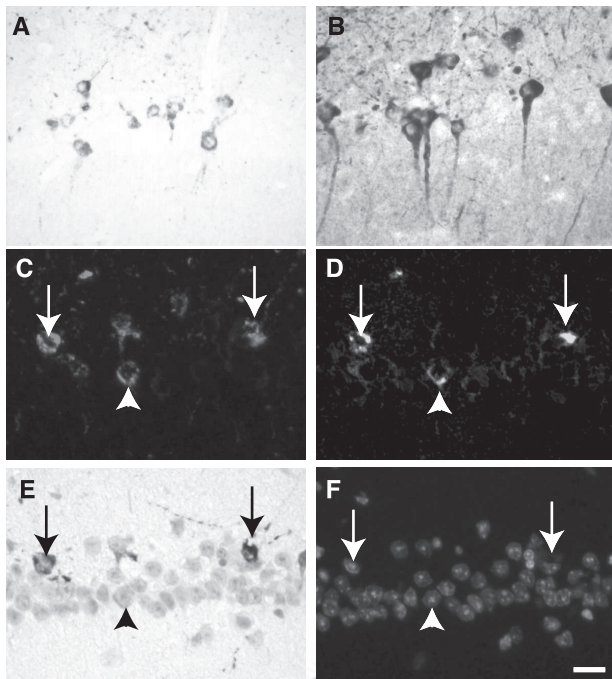


Figure 13. Immunocytochemical labeling on tissue section of the pyramidal layer of the hippocampus in 12-month-old Tg30tau mice. **A** and **B**: Immunolabeling of NFTs with the antibody to active Jun kinase (**A**) and to active GSK-3 (**B**). **C–F**: Quadruple labeling combining a double immunolabeling with the AT8 antibody (**C**) and the GSK-3 (pTyr216) antibody (**D**) and double staining with Gallyas (**E**) and 4,6-diamidino-2-phenylindole (**F**). Several neurons showing a somatodendritic phosphotau and GSK-3 immunoreactivity also contain Gallyas-positive inclusions (arrows), but some are not Gallyas-positive (arrowheads). Scale bar = 20 μ m.

neurons to form different types of fibrillary aggregates in neurodegenerative diseases.

Acknowledgments

We thank Drs. V. Baekelandt and E. Lauwers (KUL) for access and guidance to the stereology set-up facilities.

References

- Lee VMY, Goedert M, Trojanowski JQ: Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 2001, 24:1121–1159
- Rodgers-Johnson P, Garruto RM, Yanagihara R, Chen KM, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr: Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam: a 30-year evaluation of clinical and neuropathologic trends. *Neurology* 1986, 36:7–13
- Lomen-Hoerth C, Anderson T, Miller B: The overlap of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Neurology* 2002, 59:1077–1079
- Kumar-Singh S, Van Broeckhoven C: Frontotemporal lobar degeneration: current concepts in the light of recent advances. *Brain Pathol* 2007, 17:104–113
- Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR: Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 2000, 33:95–130
- Avila J, Lim F, Moreno F, Belmonte C, Cuello AC: Tau function and dysfunction in neurons—its role in neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 2002, 25:213–231
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M: Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau pro-

tein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J* 1995, 14:1304–1313

- Brion JP, Tremp G, Octave JN: Transgenic expression of the shortest human tau affects its compartmentalization and its phosphorylation as in the pretangle stage of Alzheimer disease. *Am J Pathol* 1999, 154:255–270
- Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, Trojanowski JQ, Lee VMY: Age-dependent emergence and progression of a tauopathy in transgenic mice overexpressing the shortest human tau isoform. *Neuron* 1999, 24:751–762
- Spittaels K, Van den Haute C, Van Dorpe J, Bruynseels K, Vandezande K, Laenen I, Geerts H, Mercken M, Sciot R, Van Lommel A, Loos R, Van Leuven F: Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* 1999, 155:2153–2165
- Probst A, Götz J, Wiederhold KH, Tolnay M, Mistl C, Jaton AL, Hong M, Ishihara T, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Crowther RA, Spillantini MG, Bürki K, Goedert M: Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000, 99:469–481
- Duff K, Knight H, Refolo LM, Sanders S, Yu X, Picciano M, Malester B, Hutton M, Adamson J, Goedert M, Bürki K, Davies P: Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis* 2000, 7:87–98
- Götz J, Tolnay M, Barmettler R, Chen F, Probst A, Nitsch RM: Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. *Eur J Neurosci* 2001, 13:2131–2140
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Murphy MP, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M: Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 2000, 25:402–405
- Götz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM: Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. *J Biol Chem* 2001, 276:529–534
- 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: Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005, 309:476–481
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M: Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci* 2002, 22:9340–9351
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM: Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* 2007, 53:337–351
- Tanemura K, Murayama M, Akagi T, Hashikawa T, Tominaga T, Ichikawa M, Yamaguchi H, Takashima A: Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J Neurosci* 2002, 22:133–141
- Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A: Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:13896–13901
- Ikedo M, Shoji M, Kawarai T, Kawarabayashi T, Matsubara E, Murakami T, Sasaki A, Tomidokoro Y, Ikarashi Y, Kuribara H, Ishiguro K, Hasegawa M, Yen SH, Chishti MA, Harigaya Y, Abe K, Okamoto K, George-Hyslop PS, Westaway D: Accumulation of filamentous tau in the cerebral cortex of human tau R406W transgenic mice. *Am J Pathol* 2005, 166:521–531
- Spires TL, Orne JD, SantaCruz K, Pitstick R, Carlson GA, Ashe KH, Hyman BT: Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am J Pathol* 2006, 168:1598–1607
- Bugiani O, Murrell JR, Giaccone G, Hasegawa M, Ghigo G, Tabaton M, Morbin M, Primavera A, Carella F, Solaro C, Grisoli M, Savoiardo M, Spillantini MG, Tagliavini F, Goedert M, Ghetti B: Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, 58:667–677

24. 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: Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 1998, 393:702-705
25. Heutink P, Stevens M, Rizzu P, Bakker E, Kros JM, Tibben A, Niermeijer MF, van Duijn CM, Oostra BA, van Swieten JC: Hereditary frontotemporal dementia is linked to chromosome 17q21-q22: a genetic and clinicopathological study of three Dutch families. *Ann Neurol* 1997, 41:150-159
26. Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Begard S, Brion JP, Hamdane M, Buee L: Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol* 2006, 169:599-616
27. Vidal M, Morris R, Grosveld F, Spanopoulou E: Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *EMBO J* 1990, 9:833-840
28. Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA: Reelin in plaques of β -amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* 2001, 316:145-148
29. Boutajangout A, Authalet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion JP: Cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis* 2004, 15:47-60
30. Brion JP, Hanger DP, Couck AM, Anderton BH: A68 proteins in Alzheimer's disease are composed of several tau isoforms in a phosphorylated state which affects their electrophoretic mobilities. *Biochem J* 1991, 279:831-836
31. Buée-Scherrer V, Condamines O, Mourtou-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A: AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. *Mol Brain Res* 1996, 39:79-88
32. Davis DR, Brion J-P, Couck A-M, Gallo J-M, Hanger DP, Ladhani K, Lewis C, Miller CCJ, Ruppniak T, Smith C, Anderton BH: The phosphorylation state of the microtubule-associated protein tau as affected by glutamate, colchicine and β -amyloid in primary rat cortical neuronal cultures. *Biochem J* 1995, 309:941-949
33. Brion JP, Couck AM, Robertson J, Loviny TLF, Anderton BH: Neurofilament monoclonal antibodies RT97 and 8D8 recognize different modified epitopes in PHF-tau in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1993, 60:1372-1382
34. Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E: Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* 1995, 189:167-170
35. Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Cohen P, Vanmechelen E, Vandermeeren M, Cras P: Epitope mapping of monoclonal antibodies to the paired helical filaments of Alzheimer's disease: identification of phosphorylation sites in tau protein. *Biochem J* 1994, 301:871-877
36. Hoffmann R, Lee VMY, Leight S, Varga I, Otvos L Jr: Unique Alzheimer's disease paired helical filament specific epitopes involve double phosphorylation at specific sites. *Biochemistry* 1997, 36:8114-8124
37. Hasegawa M, Jakes R, Crowther RA, Lee VMY, Ihara Y, Goedert M: Characterization of mAb AP422, a novel phosphorylation-dependent monoclonal antibody against tau protein. *FEBS Lett* 1996, 384:25-30
38. Otvos L Jr, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM-Y: Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 1994, 39:669-673
39. Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P: Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res* 1997, 48:128-132
40. Brion JP, Couck AM, Bruce M, Anderton BH, Flament-Durand J: Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities in senile plaques of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1991, 539:143-150
41. Boutajangout A, Leroy K, Touchet N, Authalet M, Blanchard V, Tremp G, Pradier L, Brion JP: Increased tau phosphorylation but absence of formation of neurofibrillary tangles in mice double transgenic for human tau and Alzheimer mutant (M146L) presenilin-1. *Neurosci Lett* 2002, 318:29-33
42. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ: Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991, 231:482-497
43. Williams RW, Rakic P: Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 1988, 278:344-352
44. Schmitz C, Hof PR: Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. *J Chem Neuroanat* 2000, 20:93-114
45. Cavalieri B: *Geometria Degli Indivisibili* [from Cavalieri (1635) *Geometria Indivisibilibus Continuum*. Bononiae: Typis Clementis Ferronij]. Italian. Torino, Unione Tipografico-Editrice Torinese, 1966
46. Hasegawa M, Smith MJ, Goedert M: Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Lett* 1998, 437:207-210
47. Goedert M, Jakes R, Crowther RA: Effects of frontotemporal dementia FTDP-17 mutations on heparin-induced assembly of tau filaments. *FEBS Lett* 1999, 450:306-311
48. Shankar SK, Yanagihara R, Garruto RM, Grundke-Iqbal I, Kosik KS, Gajdusek DC: Immunocytochemical characterization of neurofibrillary tangles in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia of Guam. *Ann Neurol* 1989, 25:146-151
49. Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF: Distribution of active glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, 58:1010-1019
50. Leroy K, Yilmaz Z, Brion JP: Increased level of active GSK-3 β in Alzheimer's disease and accumulation in argyrophilic grains and in neurons at different stages of neurofibrillary degeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007, 33:43-55
51. Ishigawa T, Sahara N, Ishiguro K, Kersh J, McGowan E, Lewis J, Hutton M, Dickson DW, Yen SH: Co-localization of glycogen synthase kinase-3 with neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* 2003, 163:1057-1067
52. Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Anderton BH: Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3 β . *J Neurochem* 2000, 74:1587-1595
53. Gambin TC, Chen F, Zambrano A, Abrahama A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu ML, Fu YF, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Bincler LI, Cryns VL: Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:10032-10037
54. Vega IE, Cui L, Propst JA, Hutton ML, Lee G, Yen SH: Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Mol Brain Res* 2005, 138:135-144
55. Lee G, Thangavel R, Sharma VM, Litsersky JM, Bhaskar K, Fang SM, Do LH, Andreadis A, Van Hoesen G, Ksiezak-Reding H: Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2004, 24:2304-2312
56. Derkinderen P, Scales TME, 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: 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* 2005, 25:6584-6593
57. Williamson R, Scales T, Clark BR, Gibb G, Reynolds CH, Kellie S, Bird IN, Varndell IM, Sheppard PW, Everall I, Anderton BH: Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid- β peptide exposure: involvement of src family protein kinases. *J Neurosci* 2002, 22:10-20
58. Bronner IF, ter Meulen BC, Azmani A, Severijnen LA, Willemsen R, Kamphorst W, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC: Hereditary Pick's disease with the G272V tau mutation shows predominant three-repeat tau pathology. *Brain* 2005, 128:2645-2653
59. Veeranna, Amin ND, Ahn NG, Jaffe H, Winters CA, Grant P, Pant HC: Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M. *J Neurosci* 1998, 18:4008-4021
60. Lin WL, Lewis J, Yen SH, Hutton M, Dickson DW: Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau. *J Neurocytol* 2003, 32:1091-1105
61. Samorajski T: Age differences in the morphology of posterior tibial nerves of mice. *J Comp Neurol* 1974, 157:439-445

62. Goldstein ME, Cooper HS, Bruce J, Carden MJ, Lee VM, Schlaepfer WW: Phosphorylation of neurofilament proteins and chromatolysis following transection of rat sciatic nerve. *J Neurosci* 1987, 7:1586–1594
63. Rosenfeld J, Dorman ME, Griffin JW, Gold BG, Sternberger LA, Sternberger NH, Price DL: Distribution of neurofilament antigens after axonal injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987, 46:269–282
64. Dickson DW, Yen SH, Suzuki KI, Davies P, Garcia JH, Hirano A: Ballooned neurons in select neurodegenerative diseases contain phosphorylated neurofilament epitopes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1986, 71:216–223
65. Munoz DG, Greene C, Perl DP, Selkoe DJ: Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 1988, 47:9–18
66. Götz J, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke YZ, Wiesner A, Schonrock N, Iltner LM: A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol* 2007, 17:91–103
67. Terwel D, Lasrado R, Snauwaert J, Vandeweert E, Van Haesendonck C, Borghgraef P, Van Leuven F: Changed conformation of mutant tau-P301L underlies the moribund tauopathy, absent in progressive, nonlethal axonopathy of tau-4R/2N transgenic mice. *J Biol Chem* 2005, 280:3963–3973
68. Ishihara T, Higuchi M, Zhang B, Yoshiyama Y, Hong M, Trojanowski JQ, Lee VMY: Attenuated neurodegenerative disease phenotype in tau transgenic mouse lacking neurofilaments. *J Neurosci* 2001, 21:6026–6035
69. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Bruschi RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LSB: Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 2005, 307:1282–1288
70. Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, Thomas JH, Trojanowski JQ, Schellenberg GD: Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:9980–9985
71. Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB: Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* 2001, 293:711–714
72. Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang DW, Rao BSS, Chattarji S, Kelleher Iii RJ, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J: Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* 2004, 42:23–36

