



HAL
open science

Fonctions atypiques de Tau en conditions physiologique et pathologique

Marie Violet

► **To cite this version:**

Marie Violet. Fonctions atypiques de Tau en conditions physiologique et pathologique. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S008 . tel-01071706

HAL Id: tel-01071706

<https://theses.hal.science/tel-01071706>

Submitted on 6 Oct 2014

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 LILLE – NORD DE FRANCE
UNIVERSITÉ DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2

Ecole doctorale Biologie-Santé

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Marie VIOLET

**FONCTIONS ATYPIQUES DE TAU EN CONDITIONS
PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE**

Soutenue publiquement le 28 février 2014 devant le jury composé de :

Mme le Dr. Ilse DEWACHTER

Rapporteur

Mme le Dr. Cristine ALVES DA COSTA

Rapporteur

Mme le Dr. Eliette BONNEFOY

Examineur

M. le Pr. Joris WINDERICKX

Examineur

Mme le Dr. Marie-Christine GALAS

Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le **Dr. Cristine Alves da Costa**, le **Dr. Eliette Bonnefoy**, le **Dr. Ilse Dewachter**, le **Pr. Joris Windericks** et le **Dr. Marie-Christine Galas** pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'accepter de faire partie de mon jury de thèse et d'examiner mon travail. Je remercie en particulier le **Dr. Cristine Alves da Costa** et le **Dr. Ilse Dewachter** pour avoir relu avec minutie mon manuscrit de thèse et évaluer le travail réalisé pendant ces trois années de thèse.

Je remercie le **Pr Pierre Formstecher** pour m'avoir accueillie au sein du centre de recherche Jean Pierre Aubert.

Je tiens également à remercier le **Dr. Luc Buée** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe « Alzheimer & Tauopathies ».

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au **Dr. Marie-Christine Galas**. Je profite de cette occasion pour vous remercier de votre grande disponibilité, votre patience et votre aide. Merci de m'avoir montré qu'il ne faut jamais prendre les dogmes pour argent comptant. Et quoi de mieux que de bousculer les idées reçues pour découvrir de nouvelles perspectives scientifiques ? Merci également de m'avoir donné l'opportunité de participer au congrès international ADPD.

Je remercie également le **Dr Bruno Lefebvre** qui nous a rejoint dans la petite équipe « Tau nucléaire ». Merci pour votre expertise et vos nombreux conseils toujours avisés. Merci au **Dr. Sandrine Humez** pour son aide dans la découpe minutieuse des hippocampes de souris.

Merci aux Docteurs **David Blum**, **Valérie Buée-Scherrer**, **Marie-Laure Caillet-Boudin**, **Morvane Colin**, **Claire-Marie Dhaenens**, **Malika Hamdane**, **Bernard Sablonnière**, **Nicolas Sergeant** et **Susanna Schraen** pour leur soutien et leurs remarques constructives durant les réunions de laboratoire.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici.

J'adresse une pensée particulière à **Lucie** pour son aide plus que précieuse durant deux années. Merci pour ton travail et d'avoir toujours été présente. Merci à **Meryem** pour ta gentillesse et toutes ses heures à quantifier la fluorescence des noyaux... ! Merci également à **Meliza** pour ton enthousiasme communicatif et ton sourire ! Bon courage à toi **Alban**, mon successeur sur ce projet. Je remercie **Andréa** pour sa bonne humeur et son accueil lorsque j'ai passé ces quelques jours à Prague. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite de ta thèse. **Elodie**, merci pour ton aide en salle d'électrophysio ! Merci à **Audrey S.** de m'avoir formée à mon arrivée et m'avoir guidée lorsque j'étais encore stagiaire.

Je tiens à remercier **Marie-Hélène Gevaert** et **Rose-Mary Siminski** du laboratoire d'histologie pour leur disponibilité et les dizaines de lames qu'elles ont monté pour ce projet ainsi que l'ensemble du personnel de l'animalerie, **Delphine Cappe** et **Taillieu, Ingrid, Julien, Mélanie et Yann**.

Je souhaite bonne continuation à mes collègues de bureau, **Dominique, Hélène et Francisco**. Cela a été très agréable de travailler auprès de vous.

Merci à **Anthony** et à **Coline** pour ces petites pauses à la cafet' ! Plus qu'un petit millier de western-blots à faire Anthony ;) Coline, je te souhaite bon courage pour cette année de Master 2.

Marie B, je te souhaite bon courage à toi, la rhétaise.

Céline et Fanny, les mots sont bien trop faibles pour vous remercier d'avoir passé ces trois années de thèse à mes cotés. C'est grâce à votre amitié que je suis enfin arrivée à bout de ce projet car vous avez toujours été là pour me soutenir quand j'en avais besoin. Je garderai toujours un merveilleux souvenir de nos délires et fous rires en tout genre et j'espère que notre amitié perdurera encore de nombreuses années. Merci à toi, « la Mauvaise » pour tes cafés gourmands et tes bons plans (pas toujours si bon que ça... ;) Tu caches derrière un caractère bien trempé, une très grande sensibilité et un cœur en or. Reste toujours telle que tu es Mistinguette. Merci aussi à la « Fille Douce », de m'avoir appris l'existence de la couleur lila !! Grande émotive, ce qui est ta force et ta faiblesse, tu as toujours été à mon écoute. Mais qui aurait pu imaginer que tu serais devenue normande d'adoption ? ^^

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire qui rendent notre cadre de travail sympathique : **Amélie, Cédric, Claire, Cyril, Maxime, Raphaëlle, Sabiha, Sébastien, Séverine, Simon**, mais aussi à toutes les « filles » du secrétariat.

Antoine et Marie-Lise, je vous souhaite plein de bonheur au bord de la mer Méditerranée.

Merci aux petits poissons, **Fatima** et **Audrey B.** pour ces moments inoubliables dans l'aquarium.

Je souhaite également remercier **mes parents, ma sœur et mon frère** de m'avoir toujours soutenu pendant ces années malgré la distance.

Enfin, merci à **Farrokh** pour une rencontre du troisième type...

RÉSUMÉ

La protéine Tau est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de Tauopathies. La plus fréquente des Tauopathies est la maladie d'Alzheimer (MA). Cette démence est caractérisée, dans les phases précoces, par une augmentation du stress oxydant dans le cerveau des patients. L'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) dans les neurones mène notamment à l'apparition de dommages au niveau de leur ADN génomique. Les neurones ne se divisant pas, l'accumulation de dommages non réparés au niveau de la molécule d'ADN induit, à terme, des conséquences importantes sur leur fonctionnement. Cependant, les mécanismes impliqués dans l'accumulation de dommages à l'ADN neuronal dans la MA ne sont pas élucidés. La MA est également caractérisée par la présence de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée. Cette protéine Tau pathologique s'agrège et forme les « dégénérescences neurofibrillaires » (ou DNF). Les mécanismes conduisant à l'agrégation de Tau dans les cerveaux Alzheimer demeurent encore peu connus. Néanmoins, il est maintenant admis que bien plus que les agrégats insolubles, ce sont des petites formes oligomériques de Tau qui sont toxiques dans les neurones.

Tau est principalement connue pour son rôle de MAP (Microtubule Associated Protein). Toutefois, en condition physiologique, elle se localise également au niveau de la membrane plasmique et au sein du noyau des neurones. Dans le laboratoire, il a été montré dans des cultures primaires de neurones murins que Tau joue un rôle essentiel dans la protection de l'ADN génomique neuronal en condition de stress. Le premier objectif de cette thèse était de savoir si *in vivo* Tau joue un rôle protecteur vis-à-vis de l'ADN. Pour répondre à cette question, nous avons mis au point un modèle murin de stress hyperthermique, stress induisant la formation de ROS. Dans ce modèle, nous avons validé *in vivo* la fonction protectrice de Tau vis-à-vis de l'ADN génomique. Nous avons également mis en évidence que l'absence de Tau altérait l'intégrité d'ARN cytoplasmiques et nucléaires en condition de stress, ce qui suggère que Tau pourrait jouer un rôle dans le contrôle qualité des ARN. Le deuxième objectif était d'évaluer l'impact de la pathologie Tau sur sa fonction protectrice de l'ADN. Notre hypothèse était que la pathologie Tau pourrait avoir un rôle délétère sur sa fonction protectrice de l'ADN génomique. L'impact de la pathologie Tau a alors été évalué *in vivo* dans un modèle de souris transgéniques (THY-Tau22). Nos résultats indiquent que dans les neurones hippocampiques soumis à un stress hyperthermique et possédant une pathologie de Tau précoce, il y a la perte de la fonction protectrice de Tau vis-à-vis de l'intégrité des acides nucléiques. Par ailleurs, nous avons observé qu'une augmentation de ROS jouait le rôle d'agent inducteur *in vivo* dans la formation de petits oligomères de Tau dans le cytoplasme et le noyau de neurones hippocampiques. De façon intéressante nous avons observé une corrélation entre les neurones possédant des dommages aux acides nucléiques et la formation de petits oligomères de Tau. Ces résultats mettent en lumière l'existence d'une fenêtre temporelle critique où une augmentation du stress oxydant induit conjointement l'oligomérisation de Tau et la formation de dommages aux acides nucléiques dans des neurones présentant une pathologie précoce. Ceci suggère que des formes oligomériques de Tau seraient impliqués dans l'altération des acides nucléiques.

Les phospholipides peuvent également servir d'agent inducteur pour l'oligomérisation de Tau. Ils sont retrouvés dans les membranes. Les radeaux lipidiques sont des microdomaines de la membrane plasmique riches en sphingolipides et en cholestérol qui pourraient servir de point de nucléation pour l'oligomérisation de Tau. Avant de pouvoir répondre à cette question, le troisième objectif a été d'étudier l'état de phosphorylation de Tau associée aux radeaux lipidiques. Nos résultats indiquent que dans le cortex de patients atteints de la MA, la protéine Tau associée aux radeaux lipidiques est hyperphosphorylée et oligomérisée.

ABSTRACT

Tau protein is involved in neurodegenerative diseases called tauopathies. The most frequent tauopathies is Alzheimer's disease (AD). This dementia is characterized, in the early phases, by an increase of oxidative stress in the brain of patients. The accumulation of reactive oxygen species (ROS) in neurons leads to the appearance of damage to genomic DNA. Neurons do not divide, so unrepaired DNA damage will have important consequences on neuronal functioning. However, mechanisms involved in DNA damage accumulation in AD have not been deciphered.

AD is also characterized by the presence of hyper and abnormally phosphorylation of Tau protein. Pathological Tau forms aggregates and leads to the formation of neurofibrillary tangles. However, mechanisms involved in the intracellular aggregation of Tau in AD brains remain unknown. Nevertheless, it is now admitted that, much more than insoluble aggregates of Tau, small oligomers are the toxic form of Tau.

Tau protein is mainly known for its MAP (Microtubule Associated Protein) function. However, in physiological condition, it can also be located at the plasmic membrane level and in neurons nucleus and therefore may have others functions. A new function of Tau was revealed in the laboratory. It was shown that Tau plays an essential role in neuronal genomic DNA protection in stress condition. This study was performed in primary neuronal cultures of embryonic mice neurons. The first objective of this thesis was to challenge the DNA protective function of Tau *in vivo*. To answer this question, we designed a murine model of hyperthermic stress, which leads to the formation of ROS. Using this model, we showed that Tau is able to protect *in vivo* the genomic DNA of hippocampal neurons of mice submitted to hyperthermic stress. We also highlighted the fact that Tau deficiency alters the integrity of cytoplasmic and nuclear ARN suggesting that Tau could play a role in quality control of RNA.

Our second objective was to study if Tau pathology has a deleterious impact on its DNA protective function. The impact of Tau pathology has been analyzed in the transgenic mouse model THY-Tau 22 mice. Our results indicate that in neurons soumitted to hyperthermic stress and with an early Tau pathology, there is the loss of the nucleic acid protective function of Tau. We also observed that hyperthermic stress plays an inducing role *in vivo* in the formation of small Tau oligomers in the nuclei and the cytoplasm of hippocampal neurons. Interestingly, we observed a correlation between nucleic acid damage and the formation of Tau oligomers suggesting that oligomers would be the toxic forms of Tau involved in the alteration of nucleic acid integrity. These results bring to light the existence of a critical time window where an increase of ROS induces both Tau oligomerization and nucleic acid damage in neurons displaying early Tau pathology.

Phospholipids, which are principally found in membranes, can be an inducing agent for Tau oligomerization. Lipid rafts are microdomains of the plasmic membrane, which are rich in sphingolipids, and cholesterol. A hypothesis is that lipid rafts could be a nucleation point for Tau oligomerisation. Before being able to answer this question, the third objectif was to study the phosphorylation and conformational state of Tau associated with rafts in physiological and pathological conditions. Our results indicate that in the cortex of AD patients, Tau associated to lipid rafts is hyperphosphorylated, abnormally conformed and oligomerized.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I / PHYSIOLOGIE DE LA PROTEINE TAU.....	1
I.1 / LA PROTEINE TAU.....	1
<i>I.1.1/ Les différentes isoformes de Tau.....</i>	1
I.1.1.1/ Isoforme foétale.....	2
I.1.1.2/ Isoformes dans le cerveau adulte.....	2
<i>I.1.2 / Structure de la protéine Tau</i>	3
I.1.2.1/ Domaine de projection.....	4
I.1.2.2/ Domaine de liaison aux microtubules.....	5
I.2 / LOCALISATIONS ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE TAU.....	5
<i>I.2.1 / Tau, une protéine cytosolique.....</i>	5
I.2.1.1 / Dynamique microtubulaire.....	5
I.2.1.2 / Implication de Tau dans la polarité axonale et accumulation d'évidence de sa fonction dans le transport axonal.....	7
<i>I.2.2 / Tau, une protéine associée à la membrane plasmique.....</i>	9
I.2.2.1 / Les radeaux lipidiques	9
I.2.2.2 / Tau et signaux de transduction.....	9
<i>I.2.3 / Tau, une protéine nucléaire.....</i>	10
I.2.3.1 / Localisation nucléaire de Tau	10
I.2.3.2 / Fonction nucléaire de Tau	11
<i>I.2.4 / Perte de fonction de Tau</i>	11
I.3 / MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES.....	13
<i>I.3.1 / Phosphorylation.....</i>	13
I.3.1.1 / Kinases.....	13
I.3.1.2 / Phosphatases.....	13
I.3.1.3 / Autres acteurs de la phosphorylation	15
<i>I.3.2 / Autres modifications post-traductionnelles.....</i>	15

I.4 / IMPACT DE LA PHOSPHORYLATION PHYSIOLOGIQUE DE TAU SUR SES DIFFERENTES FONCTIONS.	16
<i>1.4.1 / Phosphorylation de Tau et stabilisation microtubulaire</i>	16
<i>1.4.2 / Phosphorylation de Tau et transport axonal</i>	17
<i>1.4.3 / Phosphorylation physiologique de Tau et liaison à la membrane plasmique</i>	19
<i>1.4.4 / Protéine Tau nucléaire et phosphorylation</i>	19
II / LES TAUOPATHIES	21
II.1 / CONCEPT DE TAUOPATHIES	21
II.2 / FTDP-17 : DES MUTATIONS DU GENE <i>MAPT</i> CONDUISANT A LA PATHOLOGIE TAU.....	25
II.3 / MALADIE D'ALZHEIMER.....	27
<i>II.3.1 / Généralités</i>	27
II.3.1.1 / Clinique	27
II.3.1.2 / Cas génétiques	27
II.3.1.3 / Cas sporadiques	28
II.3.1.3 / Facteurs de risque	28
<i>II.3.2 / Neuropathologie</i>	29
II.3.2.1 / Plaques amyloïdes.....	30
II.3.2.2 / Dégénérescences neurofibrillaires	32
<i>II.3.3 / L'hippocampe</i>	33
III / AGREGATION DE LA PROTEINE TAU	37
III.1 / STRUCTURE ET MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES IMPLIQUEES DANS L'AGREGATION DE TAU	37
<i>III.1.1 / Phosphorylation anormale et agrégation de Tau</i>	37
<i>III.1.2 / Autres modifications post-traductionnelles et agrégats de Tau</i>	39
<i>III.1.3 / Mutations et agrégats de Tau</i>	39
III.2 / LES OLIGOMERES DE PROTEINES TAU.....	39
<i>III.2.1 / Mécanismes d'oligomérisation de Tau</i>	40
III.2.1.1 / Généralités	40
III.2.1.1 / Stress oxydant et oligomérisation de Tau	41
III.3 / OLIGOMERES SOLUBLES OU AGREGATS INSOLUBLES, QUELLES SONT LES FORMES TOXIQUES DE TAU ?.....	42

III.3.1 / Les agrégats insolubles de Tau, les formes inertes	42
III.3.2 / Des oligomères insolubles de Tau, les formes toxiques	43
III.4 / IMPACT DE LA PATHOLOGIE TAU SUR SES DIFFERENTES FONCTIONS	45
III.4.1 / Pathologie Tau et stabilisation des microtubules	45
III.4.2 / Transport axonal et pathologie Tau	46
III.4.3 / Liaison à la membrane plasmique et pathologie Tau	47
III.4.4 / Pathologie Tau et signalisation neuronale	47
III.4.5 / Impact sur la fonction nucléaire de Tau	48
IV / DOMMAGES AUX ACIDES NUCLEIQUES DANS LES TAUOPATHIES	49
IV.1 / L'ADN, LE SUPPORT DE L'INFORMATION GENETIQUE	49
IV.1.1 / Structure	49
IV.1.2 / Origines des lésions	51
IV.1.3 / Les principales voies de réparation de l'ADN	52
IV.2 / LES ARN, EFFECTEURS DE L'EXPRESSION DE L'ADN EN PROTEINE	53
IV.2.1 / Généralités et structure	53
IV.2.2 / Origines des lésions	54
IV.3 / LE STRESS OXYDANT, UN AGENT INDUCTEUR DE DOMMAGES AUX ACIDES NUCLEIQUES NEURONAUX DANS LES TAUOPATHIES.....	55
II.3.1 / Stress oxydant et Tauopathies	55
II.3.2 / Stress oxydant et dommages à l'ADN	56
II.3.2 / Stress oxydant et dommages aux ARN	56
OBJECTIFS DE L'ETUDE	60
RESULTATS	65
I/ ROLE PROTECTEUR DE TAU VIS-A-VIS DE L'ADN ET D'ARN IN VIVO EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE ET DE STRESS HYPERTHERMIQUE	66
I.1/ OBJECTIFS	66
I.2/ RESULTATS	66

II/ OLIGOMERISATION DE TAU ET DOMMAGES AUX ACIDES NUCLEIQUES INDUITS PAR UN STRESS HYPERTHERMIQUE DANS LE MODELE MURIN THY-TAU22	91
II.1/ OBJECTIFS.....	91
II.2/ RESULTATS.....	91
<i>1.2.1/ Le stress n'induit pas de dommages aux acides nucléiques dans l'hippocampe des souris sauvages</i>	<i>128</i>
 III/ CARACTERISATION DE L'ETAT DE PHOSPHORYLATION DE LA PROTEINE TAU ASSOCIEE AUX RADEAUX LIPIDIQUES EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE.....	133
III.1/ OBJECTIFS	133
II.2/ MATERIEL ET METHODES.....	133
<i>II.2.1/ Isolation des radeaux lipidiques.....</i>	<i>133</i>
<i>III.2.1/ Anticorps utilisés.....</i>	<i>134</i>
III. 3/ RESULTATS	135
<i>III.3.1/ Caractérisation de l'état de phopshorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques dans du cortex de souris sauvages.....</i>	<i>135</i>
<i>III.3.1/ Caractérisation de l'état de phopshorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques dans des cerveaux humains</i>	<i>136</i>
 DISCUSSION	140
 CONCLUSION ET PERSPECTIVES	152
 BIBLIOGRAPHIE	156
 ANNEXES.....	187

ABRÉVIATIONS

A β : peptide β -amyloïde

ADN : acide désoxyribonucléique

AICD : APP intracellular domain

APOE : apolipoprotéine E

APP : amyloid precursor peptide

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BER : Base excision repair

CA : Corne d'Ammon

Cam K II : Calcium- and calmodulin-dependent Protein Kinase II

CDK : Cyclin dependant kinase

CLU : clusterine

CR1 : Récepteur 1 du complément

DAPI : di arninido phenyl indol

DCB : démence cortico basale

DNF : dégénérescence neurofibrillaire

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

GPI : Glyco phosphatidyl inositol

GSK 3 β : glycogen synthase kinase 3 β

FTDP-17 : démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17

HAPs : hydrocarbures aromatiques polycycliques

JIP1 : c-Jun-N-terminal kinase-interacting protein 1

kDa : KiloDalton

MA : maladie d'Alzheimer

MAP : microtubules-associated proteins

MAPK : mitogen activated protein kinase

MARK : Microtubule Affinity Regulating Kinase

MCI : Mild Cognitive Impairment

MMR : Mismatch repair

NER : Nucleotide excision repair

NHEJ : Non homologue end-joining

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NMNAT : Nicotinamide MonoNucleotide Adenylyl Transferase

8 OHdG : hydroxylated nucleoside 8-hydroxy-2-deoxyguanosine

PAD : phosphatase-activating domain

PAF : paraformaldehyde

PDPK : Proline directed protein kinase

PI3K : phosphoinositide 3 phosphate

PHF : paired helical filaments

PKA : Protein kinase A

PKC : Protein kinase C

PLC γ : Phospholipase C γ

PP1 : Protein phosphatase 1

PP5 : Protein phosphatase 5

PP2A : Protein phosphatase 2A

PP2B : Protein phosphatase 2B

PPP : Phospho-protein phosphatase

PSP : Paralysie supranucléaire progressive

ROS : Reactive oxygen species

SAPK : Stress activated protein kinase

SDS- PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SH3 : SRC Homology 3 Domain

SNC : système nerveux central

SOD1 : Superoxide Dismutase 1

Tau : Tubulin Associated Protein

TCA : Tricloroacetic acid

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

TOC1 : Tau Oligomeric Complex 1

VIP : vasoactive intestinal peptide

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du gène de la protéine Tau humaine, de son transcrit primaire et des six isoformes résultant de l'épissage alternatif du transcrit primaire dans le cerveau humain.....	3
Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la protéine Tau.....	4
Figure 3 : Dynamique microtubulaire et rôle de Tau.....	6
Figure 4 : Transport axonal.....	8
Figure 5 : Différentes localisations et fonctions pour la protéine Tau.....	12
Figure 6 : Phosphorylation de Tau et dynamique microtubulaire.....	17
Figure 7 : Impact de la phosphorylation de la partie amino-terminale de Tau sur le transport axonal.....	18
Figure 8 : Classification biochimique des Tauopathies.....	23
Figure 9 : Structure des agrégats de Tau dans certaines Tauopathies.....	25
Figure 10 : Mutations du gène <i>MAPT</i>	26
Figure 11 : Illustration de l'atrophie corticale observée dans la maladie d'Alzheimer..	29
Figure 12 : Dessin original d'Aloïs Alzheimer.....	30
Figure 13 : Voies du métabolisme de l'APP.....	31
Figure 14 : progression cérébrale de la DNF au cours de la maladie d'Alzheimer.....	33
Figure 15 : Comparaison, par le neuroscientifique hongrois László Seress, d'une préparation d'un hippocampe et d'un fornix humain avec un hippocampe (animal).	34
Figure 16 : Emplacement de l'hippocampe dans le cerveau de souris et description générale de la boucle trisynaptique.....	35
Figure 17 : Les différents sites de phosphorylation des protéines Tau impliqués dans la maladie d'Alzheimer.....	38
Figure 18 : Différents effecteurs de l'oligomérisation de Tau.....	40
Figure 19 : Différentes espèces de Tau en fonction du temps.....	44
Figure 20 : Impact de l'agrégation de Tau sur le transport axonal.....	46
Figure 21 : Double hélice d'ADN.....	50
Figure 22 : Dommages à l'ADN, causes et systèmes de réparation.....	53
Figure 23 : Immunohistochimie dans la CA 1 de souris sauvages âgées de 7 mois avec AT8.....	129
Figure 24 : Immunohistochimie dans la CA 1 de souris sauvages âgées de 7 mois. avec PT212.....	130
Figure 25 : Immunohistochimie dans la CA 1 de souris sauvages âgées de 7 mois avec TOC1.....	131

Figure 26 : Effet d'un stress hyperthermique sur la protéine Tau nucléaire des souris sauvages âgées de 7 mois.....	132
Figure 27 : Caractérisation de l'état de phosphorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques d'hippocampe de souris sauvages.	136
Figure 28 : Localisation de Tau dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques provenant de cerveaux de patients sains et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.	137

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification de différentes Tauopathies	22
Tableau 2 : Différents types d'ARN	54
Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés afin de caractériser l'état de phosphorylation des radeaux lipidiques	134

INTRODUCTION

I / PHYSIOLOGIE DE LA PROTÉINE TAU

Dans le milieu des années 1970, la protéine Tau (pour le terme anglais « Tubulin Associated Protein ») a été identifiée pour la première fois comme une actrice essentielle pour l'assemblage du réseau microtubulaire (Weingarten *et al.*, 1975). Cette protéine principalement localisée dans le système nerveux central, et plus particulièrement au niveau des neurones, participe par son rôle de MAP (« Microtubule Associated Protein »), au maintien du réseau microtubulaire. Cette fonction de la protéine Tau participe au bon fonctionnement neuronal. Outre sa localisation au niveau des microtubules, Tau a également été décrite au niveau de la membrane plasmique (Brandt *et al.*, 1995) et au niveau du noyau des neurones (Loomis *et al.*, 1990) suggérant que Tau serait bien plus qu'une simple MAP.

Après avoir brièvement décrit le gène et la structure de cette protéine, nous nous attarderons sur ses différentes fonctions.

I.1 / LA PROTÉINE TAU

I.1.1/ LES DIFFÉRENTES ISOFORMES DE TAU

Chez l'humain, le gène *MAPT* localisé sur le chromosome 17 (position 17q21) code pour la protéine Tau (Neve *et al.*, 1986). Le transcrit primaire de la protéine Tau humaine contient 16 exons (Andreadis *et al.*, 1992) (Figure n° 1). Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont des exons constitutifs. Les exons -1 et 14 sont transcrits mais non traduits puisqu'ils se trouvent respectivement au niveau de la région promotrice et au niveau de l'extrémité 3' non traduite de ce transcrit primaire.

Dans le cerveau humain, les exons 4a et 8 sont systématiquement exclus. Les exons 2, 3, 6 et 10 sont épissés de manière alternative. L'exon 6 est minoritaire (Luo *et al.*, 2004). Ainsi les principaux exons alternatifs sont les exons 2, 3 et 10. De plus, l'exon 3 n'apparaît jamais indépendamment de l'exon 2. L'épissage alternatif conduit par conséquent à la production de 6 isoformes protéiques majoritaires dans le cerveau adulte humain.

I.1.1.1/ Isoforme fœtale

Au cours du développement, l'expression des protéines Tau est régulée. En effet, une seule isoforme est présente à la naissance, dépourvue des exons alternatifs, puis les autres isoformes apparaissent progressivement (Takuma *et al.*, 2003).

I.1.1.2/ Isoformes dans le cerveau adulte

Dans le cerveau adulte, les 6 isoformes protéiques majeures de Tau présentent une taille comprise entre 441 et 352 acides aminés et une masse apparente de 65 à 45 kDa en gel SDS-PAGE (Buée *et al.*, 2000). Ces isoformes de Tau se distinguent par la présence ou l'absence d'un ou deux inserts au niveau de la partie amino-terminale et de 3 (isoformes 3R) ou 4 (isoformes 4R) domaines de liaison aux microtubules dans la partie carboxy-terminale. Les inserts du côté amino-terminal correspondent aux séquences codées par les exons 2 et 3. Le domaine de liaison aux microtubules, présent ou non en fonction de l'isoforme, correspond à la séquence codée par l'exon 10.

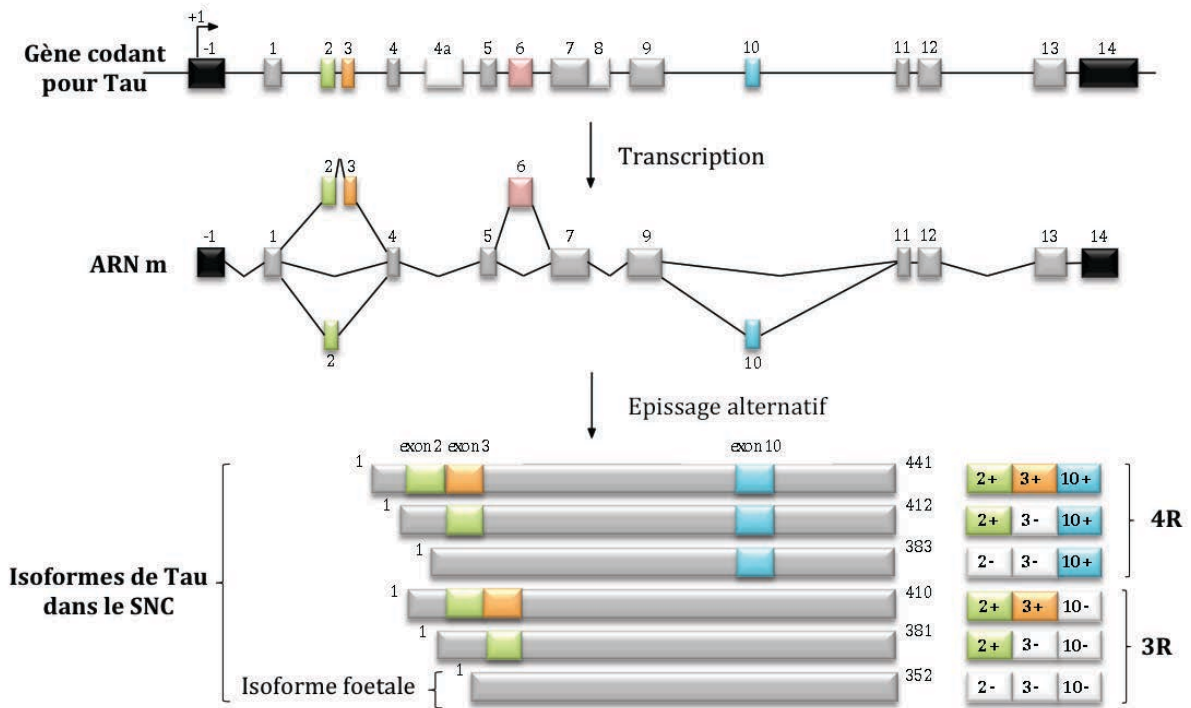


Figure 1 : Représentation schématique du gène de la protéine Tau humaine, de son transcrit primaire et des six isoformes résultant de l'épissage alternatif du transcrit primaire dans le cerveau humain. Le gène de la protéine Tau humaine appelé *MAPT* est localisé au niveau du bras long du chromosome 17 en position 17q21. Il contient 16 exons (ligne du haut). Dans le cerveau humain, les exons 4a et 8 ne sont pas transcrits. L'exon 6 est très minoritaire (ligne médiane). Les exons -1 et 14 sont transcrits mais non traduits. Les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont constitutifs. Les exons 2, 3 et 10 sont épissés de manière alternative. L'exon 3 n'apparaît jamais indépendamment de l'exon 2. Il en résulte 6 isoformes majoritaires pour la protéine Tau humaine dans le SNC de longueur comprise entre 352 et 441 acides aminés. L'isoforme la plus courte et retrouvée dans le cerveau foetal (ligne du bas). (Adapté de Sergeant *et al.*, 2008).

I.1.2 / STRUCTURE DE LA PROTÉINE TAU

De façon générale, la protéine Tau est une molécule flexible qui ne possède pas de conformation particulière lorsqu'elle est en solution (Schweers *et al.*, 1994). On peut distinguer deux régions au niveau de la structure primaire de la protéine Tau (Figure n°2). La première est un **domaine de projection** impliqué dans l'interaction de Tau

avec des éléments du cytosquelette et avec la membrane plasmique (Brandt *et al.*, 1995). Cette région est située dans la partie amino-terminale (N-ter) de la protéine. La deuxième région est un **domaine de liaison aux microtubules**. Elle se situe dans la partie carboxy-terminale (C-ter) de la protéine et permet la liaison aux microtubules (Pour revue (Kolarova *et al.*, 2012)).

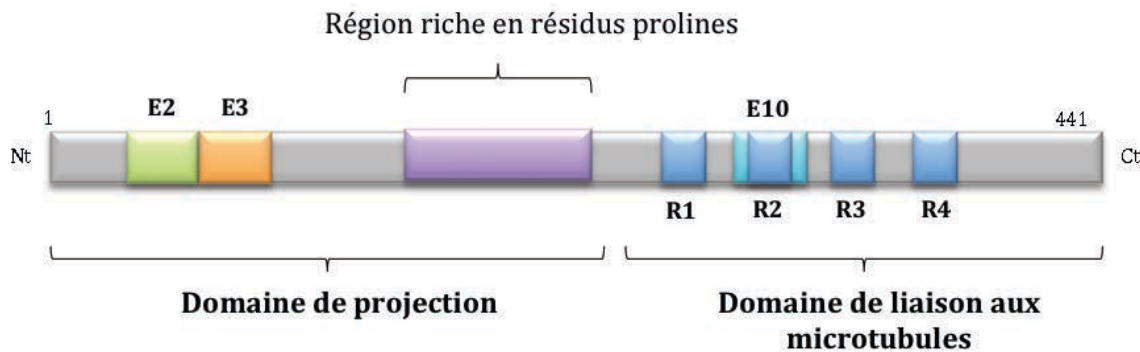


Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la protéine Tau. L'isoforme représentée ici est la plus longue, contenant les exons 2, 3 et 10 (notés E2, E3 et E10). La protéine Tau possède deux domaines distincts. Le domaine de projection se trouve du côté amino-terminal et contient une région riche en résidus prolines. Le domaine de liaison aux microtubules situé du côté carboxy-terminal contient 4 domaines de répétition (notés R1 à R4) (Adaptée de Buée *et al.*, 2000)

I.1.2.1/ Domaine de projection

Le domaine de projection possède une longueur variable. Cette longueur dépend de la présence ou non d'un ou de deux inserts codés par les exons 2 et 3. Ces inserts sont composés de 29 acides aminés chacun, principalement acides. A côté de cette région acide, on trouve une région plus basique enrichie en résidus proline. Cette région riche en proline permet l'interaction de Tau avec l'actine (He *et al.*, 2009), la membrane plasmique (Brandt *et al.*, 1995) ainsi que des tyrosines kinases de la famille de Src (Lee, 2005). Le domaine de projection constitue une extrémité libre (Hirokawa *et al.*, 1988) qui permet de déterminer la distance entre les microtubules des axones. Ceci est la conséquence d'une répulsion électrostatique entre cette région et les microtubules, tous deux étant chargés négativement (Ballatore *et al.*, 2007).

I.1.2.2/ Domaine de liaison aux microtubules

Le domaine de liaison aux microtubules contient 3 ou 4 régions répétées en fonction de l'inclusion ou non de l'exon 10. Ainsi on distingue les isoformes de Tau 3R (avec 3 régions répétées) des isoformes 4R (avec 4 régions répétées). Dans le cerveau adulte normal, les isoformes de Tau 3R et 4R sont exprimées de façon équivalente (Goedert and Jakes, 1990). Chacune des régions répétées est composée de 18 acides aminés. Elles sont séparées entre elles par 13 ou 14 acides aminés (Harada *et al.*, 1994). Ces séquences répétées permettent l'interaction de Tau avec les microtubules. Ainsi, les isoformes de Tau 4R ont une plus grande affinité pour les microtubules que les isoformes de Tau 3R (Goedert and Jakes, 1990). Elles stabilisent par conséquent davantage le réseau microtubulaire (Goedert and Jakes, 1990; Hong *et al.*, 1998). De plus, le domaine de liaison aux microtubules étant chargé positivement, il est donc capable d'interagir avec la surface des microtubules chargée négativement (Ballatore *et al.*, 2007).

I.2 / LOCALISATIONS ET FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE TAU

La fonction la plus connue pour la protéine Tau est son rôle de MAP au sein du cytosol. Cependant d'autres localisations, et ainsi d'autres fonctions de Tau ont été mises en évidence. Dans ce chapitre les différents rôles de Tau seront discutés ainsi que l'impact de sa phosphorylation physiologique sur ses fonctions.

I.2.1 / TAU, UNE PROTÉINE CYTOSOLIQUE

I.2.1.1 / Dynamique microtubulaire

Les microtubules sont des composants du cytosquelette impliqués dans la morphologie et le transport de molécules dans les neurones. Les microtubules sont formés à partir de

dimères de tubulines α et β . Ces dimères s'associent en protofilaments qui à leur tour forment un microtubule (Figure n°3). Les microtubules possèdent une structure dynamique. La longueur d'un microtubule peut atteindre 25 nanomètres et dépend d'un équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation des dimères de tubulines. Ceci forme un système dynamique.

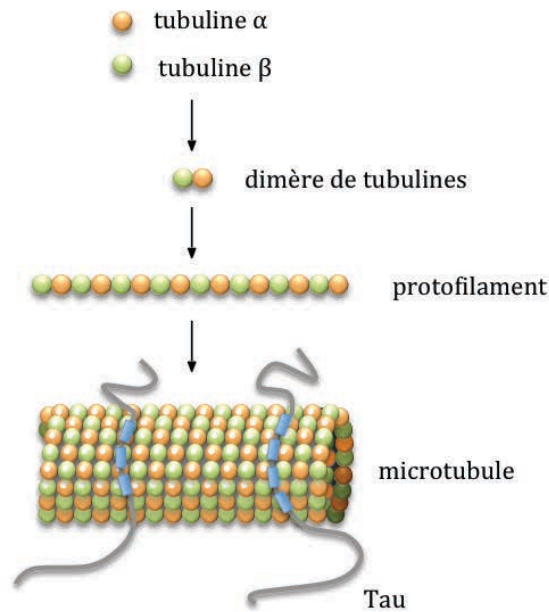


Figure 3 : Dynamique microtubulaire et rôle de Tau. Les monomères de tubuline α et β s'associent pour former des dimères de tubulines puis des protofilaments. Les protofilaments forment ensuite des microtubules. Les protéines Tau permettent aux microtubules de s'associer en faisceaux et confèrent une meilleure stabilité au squelette microtubulaire.

La protéine Tau interagit directement avec les microtubules (Breuzard *et al.*, 2013). Cette interaction se fait notamment par l'intermédiaire des domaines de répétitions situés sur la partie carboxy-terminale de Tau. Elle permet une meilleure stabilité du système (Drechsel *et al.*, 1992).

I.2.1.2 / Implication de Tau dans la polarité axonale et accumulation d'évidence de sa fonction dans le transport axonal

Les microtubules sont des structures polarisées. L'extrémité positive est le lieu de la polymérisation alors que la dépolymérisation se situe au niveau de l'extrémité négative. Cette organisation permet le maintien de l'organisation du neurone en deux compartiments, un compartiment somato-dendritique et un prolongement axonal. (Caceres and Kosik, 1990 ; Baas *et al.*, 1991 ; Harada *et al.*, 1994).

La protéine Tau, en collaboration avec d'autres MAP permet la stabilisation de ces microtubules polarisés en faisceaux. Cette organisation est essentielle pour le développement de prolongements cellulaires et plus particulièrement de l'axone. En effet, l'inhibition de l'expression de Tau à l'aide d'ARN anti-sens engendre un retard de croissance neuritique dans des cultures primaires de neurones de souris (Caceres and Kosik, 1990) et la prévient totalement dans une lignée cellulaire neuronale (Esmaeli-Azad *et al.*, 1994). Ces résultats ont été confirmés dans des cultures primaires de neurones hippocampaux de souris déficientes en protéines Tau (Dawson *et al.*, 2001). Tau possède donc une fonction essentielle dans la croissance neuritique.

Le transport axonal est un processus cellulaire important responsable du mouvement de nombreuses molécules dans le neurone. Les microtubules constituent le squelette des axones et servent de « rails » aux protéines motrices (Figure n°4).

Ces protéines motrices nommées kinésines et dynéines se lient à des « cargos » qui peuvent être des organelles, des vésicules ou des complexes protéiques. Elles permettent ainsi leur mouvement. Les kinésines permettent le transport du corps cellulaire du neurone vers la terminaison axonale (extrémité positive). Ce transport est appelé antérograde (Hirokawa *et al.*, 1991). Les dynéines, quant à elles, en formant un complexe avec la dynactine, permettent le transport rétrograde, des synapses vers le noyau (Paschal and Vallee, 1987).

Tau participe au transport axonal par son interaction avec ces protéines motrices. Des expériences *in vitro* ont montré une interaction directe entre Tau et la protéine p150 qui appartient au complexe protéique dynéine-dynactine (Magnani *et al.*, 2007). D'autres études ont démontré la liaison de Tau avec la kinésine *in vitro* (Jancsik *et al.*, 1996) et

dans des cultures primaires de neurones de souris (Utton *et al.*, 2005). L'interaction directe de Tau avec la kinésine a pour conséquence le détachement des kinésines des microtubules et diminue ainsi le transport antérograde (Dixit *et al.*, 2008). Tau est également capable de se lier à la protéine JIP1 (c-Jun-N-terminal kinase-interacting protein 1) qui est associée au complexe de transport incluant la kinésine. L'interaction de Tau avec JIP1 conduit également à la perturbation du transport antérograde dans l'axone du neurone (Ittner *et al.*, 2009).

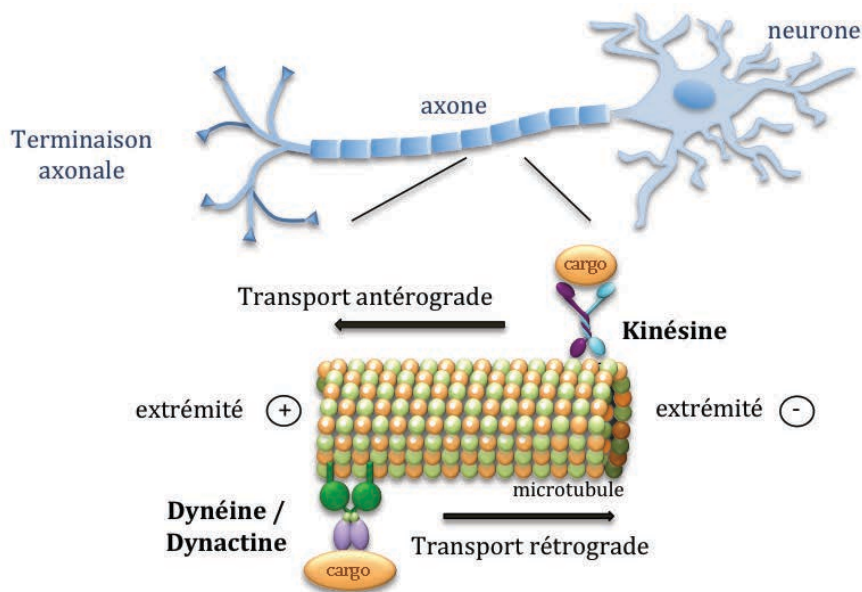


Figure 4 : Transport axonal. Les neurones sont des cellules polarisées comprenant un compartiment somato-dendritique et un axone. Les moteurs moléculaires de type kinésine et dynéine assurent respectivement le transport axonal antérograde (vers l'extrémité +) et rétrograde (vers l'extrémité -).

Cependant l'impact véritable de Tau dans le transport axonal n'est pas si simple. En effet, la liaison de Tau aux microtubules dans les conditions physiologiques ne semble pas modifier le transport axonal. Morfini *et collaborateurs* montrent en 2007 que l'interaction de la protéine Tau monomérique aux microtubules ne perturbe pas ce transport (Morfini *et al.*, 2007). La délétion de Tau dans des modèles murins n'inhibe pas non plus le transport axonal (Yuan *et al.*, 2008). Toutefois, *in vitro*, à des concentrations 50 fois supérieures à la normale, toutes les isoformes de Tau inhibent le transport axonal (Morfini *et al.*, 2007).

I.2.2 / TAU, UNE PROTÉINE ASSOCIÉE À LA MEMBRANE PLASMIQUE

Différentes études montrent que la protéine Tau, par l'intermédiaire de son domaine de projection, peut interagir avec la membrane plasmique (Brandt *et al.*, 1995) (Arrasate *et al.*, 2000 ; Ekinci and Shea, 2000). Cette interaction se fait principalement *via* la région riche en résidus proline de Tau (motif PXXP) avec les domaines SH3 des protéines kinases de la famille Src. Ces kinases sont localisées dans des microdomaines membranaires appelés « radeaux lipidiques » (ou « lipid rafts ») (Liang *et al.*, 2001).

I.2.2.1 / Les radeaux lipidiques

Bien que plus fréquemment rencontrés au niveau de la membrane plasmique, les radeaux lipidiques peuvent également être observés au niveau de l'appareil de Golgi et des lysosomes. Ce sont des portions de la membrane riches en sphingolipides et cholestérol. Les radeaux lipidiques contiennent notamment des protéines ancrées à l'aide d'un phosphatidylinositol (GPI), des protéines tyrosines kinases de la famille Src, et des protéines transmembranaires (Simons and Toomre, 2000). Leur assemblage n'est pas figé mais plus ordonné et compact que la bicouche environnante (Simons and Ehehalt, 2002). Ainsi ils influencent la fluidité des membranes. Les radeaux lipidiques constituent également des points d'ancrage essentiels pour l'assemblage de molécules de signalisation. De ce fait, ils participent à la neurotransmission (Korade and Kenworthy, 2008).

I.2.2.2 / Tau et signaux de transduction

La liaison de Tau avec les radeaux lipidiques se fait principalement avec les protéines kinases de la famille Src. Parmi les kinases de la famille Src, Fyn interagit avec Tau (Lee *et al.*, 1998; Krylova *et al.*, 2005). Fyn phosphoryle les résidus tyrosines de protéines impliquées dans différentes voies de signalisation régulant ainsi leurs fonctions (Yang *et*

al., 2011). A travers son interaction avec la protéine Fyn, Tau pourrait intervenir dans certaines voies de transduction de signaux.

Tau permet l'apport de Fyn au niveau de l'élément post-synaptique (Ittner *et al.*, 2010). A ce niveau, Fyn régule le fonctionnement de récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) en phosphorylant l'une de ses sous-unités (Trepanier *et al.*, 2012). Tau participerait donc indirectement à l'activation de ce récepteur qui est impliqué dans des phénomènes mnésiques.

Une étude met également en évidence l'interaction de Tau avec les domaines SH3 d'autres protéines de signalisation intracellulaire que sont PI3K, PLC γ 1 et Grb2 (Reynolds *et al.*, 2008). Ainsi Tau posséderait un rôle étendu dans la signalisation cellulaire via son interaction avec ces protéines.

I.2.3 / TAU, UNE PROTÉINE NUCLÉAIRE

Différentes études ont montré que Tau pouvait se localiser au niveau du compartiment nucléaire. Tau pourrait donc avoir une fonction biologique au niveau du noyau des cellules.

I.2.3.1 / Localisation nucléaire de Tau

La protéine Tau a été décrite pour la première fois au niveau du compartiment nucléaire de cellules en 1990 (Loomis *et al.*, 1990). Ces cellules incluent notamment des macrophages et des lignées cellulaires de neuroblastomes humains. Depuis, Tau a été observé dans le noyau de différents types cellulaires. Elle est localisée au niveau du noyau de neurones (Brady *et al.*, 1995; Adamec *et al.*, 2002; De Barreda *et al.*, 2010), de lignées cellulaires neuronales (Loomis *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Greenwood and Johnson, 1995; Thurston *et al.*, 1997) et non neuronales (Sjöberg *et al.*, 2006).

Le noyau des cellules eucaryotes contient l'essentiel du matériel génétique de la cellule. Il contient également le nucléole, lieu de synthèse des ARN ribosomiques. Tau se localise spécifiquement au niveau du nucléole de cellules de lignées neuronales humaines et de

singes (Loomis *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Greenwood and Johnson, 1995). Dans des cellules tumorales Hela ainsi que dans des fibroblastes humains, Tau est également observée au niveau de la région organisatrice du nucléole (Sjöberg *et al.*, 2006).

Toutefois, aucune étude réalisée à partir de lignées cellulaires neuronales murines n'a pu distinguer une localisation nucléaire particulière pour la protéine Tau (Loomis *et al.*, 1990; Lambert *et al.*, 1995; Sultan *et al.*, 2011). La localisation nucléolaire de Tau a donc été observée uniquement dans des cellules de primates.

I.2.3.2 / Fonction nucléaire de Tau

Le rôle de la protéine Tau nucléaire reste aujourd'hui peu connu dans les neurones. Cependant elle est décrite dans la région organisatrice du nucléole (Sjöberg *et al.*, 2006). Tau pourrait alors jouer un rôle important dans l'organisation du nucléole et/ou l'hétérochromatisation des ARN ribosomiaux dans les neurones.

La littérature relate également l'implication de Tau dans la stabilisation et la protection de l'ADN. En effet, une étude *in vitro*, a montré que la protéine Tau est capable de protéger l'ADN de la dénaturation thermique (Hua and He, 2003) et de l'attaque par les radicaux libres (Wei *et al.*, 2008). A l'inverse une étude *in vitro* montre que Tau, en se liant à l'ADN, altère sa conformation et de ce fait diminue sa stabilité le rendant plus vulnérable à la digestion par les DNAses. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces altérations pourrait conduire, à terme, à une dysfonction neuronale notamment suite à une dérégulation de l'expression de gènes (Padmaraju *et al.*, 2010).

Des travaux réalisés au laboratoire ont montré que la protéine Tau nucléaire est capable de protéger l'ADN neuronal des dommages induits par un stress hyperthermique dans un modèle de culture primaire de neurones corticaux de souris (Sultan *et al.*, 2011). Le stress hyperthermique est utilisé comme outil pour induire de façon très reproductible un stress oxydant (Bruskov *et al.*, 2002). Grâce à la méthode du test des comètes, réalisées sur des neurones sauvages et déficients en protéine Tau, il a été montré que Tau protège l'intégrité de leur ADN génomique (Sultan *et al.*, 2011).

Les mécanismes par lesquels Tau protège l'ADN sont aujourd'hui très peu connus. L'une des explications possible est que Tau jouerait son rôle protecteur en se liant à la molécule d'ADN. Cette hypothèse s'appuie sur différentes études *in vitro* qui ont mis en évidence la liaison directe de la protéine Tau au simple brin (Krylova *et al.*, 2005) et au double brin d'ADN (QHuaa, 2003 ; Camero *et al.*, 2013). Cette liaison se ferait au niveau des séquences riches en A/T de l'ADN, au niveau de son petit sillon (Sjöberg *et al.*, 2006; Sultan *et al.*, 2011). Cette interaction se fait très probablement par la région riche en proline de Tau et les domaines de liaison aux microtubules (Sultan *et al.*, 2011).

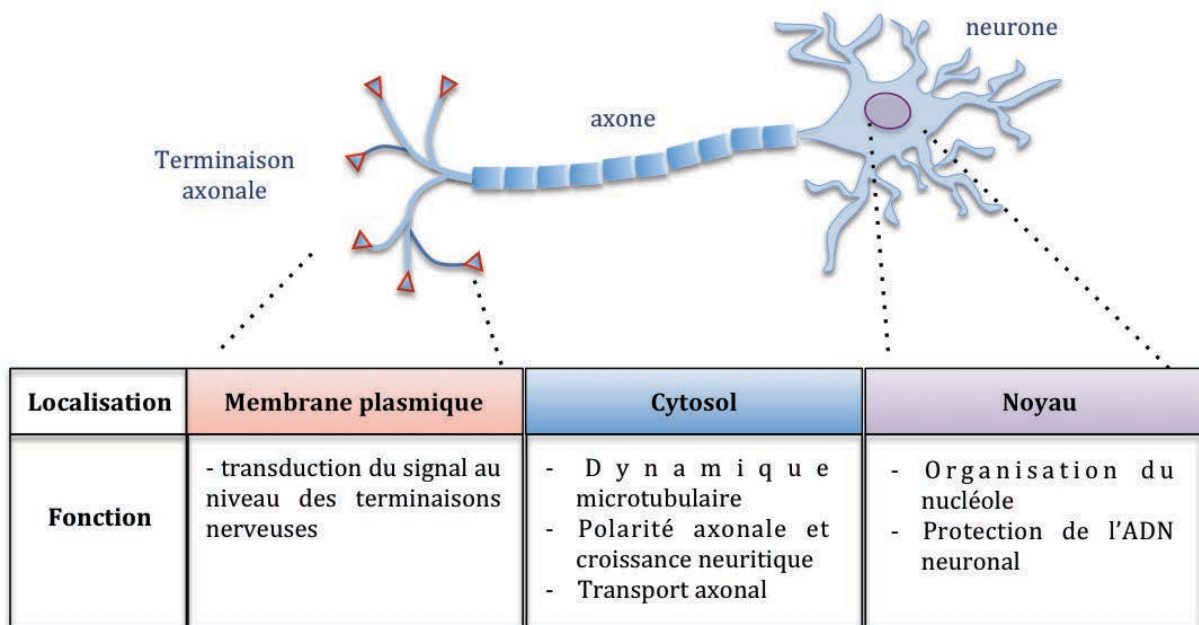


Figure 5 : Différentes localisations et fonctions de Tau

I.2.4. / PERTE DE FONCTION DE TAU

Au vu des nombreux rôles de la protéine Tau, on pourrait imaginer que la perte de fonction de Tau entrainerait des conséquences importantes sur l'ensemble de ses fonctions. Cependant, les souris déficientes en protéines Tau sont viables, se reproduisent et présentent peu d'altérations cognitives (Harada *et al.*, 1994 ; Dawson *et al.*, 2001). Ces souris ont peu de caractéristiques physiques mis à part une faiblesse musculaire et une hyperactivité (Ikegami *et al.*, 2000). Nous pouvons expliquer ce phénomène par la présence probable d'autres MAP qui vont compenser l'absence de

protéine Tau. Harada *et collaborateurs* montrent notamment une augmentation de la quantité de MAP1A dans le cerveau de souris déficientes en Tau (Harada *et al.*, 1994).

I.3 / MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

La protéine Tau subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui régulent son activité (Pour revue (Martin *et al.*, 2011)). La phosphorylation est la plus importante en terme de résidus impliqués. Elle possède un impact important sur les différentes fonctionnalités de Tau. C'est pourquoi nous allons nous attarder plus particulièrement sur cette dernière.

I.3.1 / PHOSPHORYLATION

La phosphorylation consiste en l'ajout d'un groupement phosphate, fourni par l'ATP (Adénosine Tri Phosphate), par estérification d'un résidu sérine, thréonine ou tyrosine. Il existe donc 85 sites potentiels de phosphorylation sur l'isoforme la plus longue de Tau. Parmi ces sites, 71 peuvent être phosphorylés dans les conditions physiologiques et pathologiques. La phosphorylation de Tau est régulée par l'action antagoniste d'enzymes, les kinases et phosphatases. Cette régulation est fondamentale pour les fonctions de la protéine Tau (*cf.* chapitre I.5).

I.3.1.1 / Kinases

Les kinases sont des enzymes de la famille des transférases qui catalysent le transfert d'un groupe phosphorylé d'une molécule à une autre. Elles sont par conséquent responsables de la phosphorylation de Tau. Plus de 30 kinases peuvent la phosphoryler. Communément, les enzymes ciblant les résidus sérines et thréonines sont divisées en 3 groupes distincts: les PDPK, les non-PDPK et la famille des glycoènes synthétases. Un quatrième groupe comporte les kinases phosphorylant des résidus tyrosines.

Le premier groupe est composé de l'ensemble des enzymes qui phosphorylent Tau sur des sérines et thréonines qui suivent des résidus prolines. Ces enzymes sont nommées **PDPK** pour le terme anglais « Proline Directed Protein Kinases ». Dans ce groupe, nous pouvons citer par exemple, la « Mitogen Activated Protein Kinase » ou MAPK (Drewes *et al.*, 1992), les « Cyclin Dependent Kinases » telles que CDK2 et 5 (Baumann *et al.*, 1993), et plusieurs « Stress Activated Protein Kinases » SAPKs (Goedert *et al.*, 1997).

Le second groupe est celui des kinases **non-PDPK** pour « Non Proline Directed Protein Kinases ». Ces enzymes phosphorylent des sérines et thréonines et incluent la « Cyclin AMP-dependent Protein Kinase » (ou PKA) (Jicha *et al.*, 1999), la « Calcium- and calmodulin-dependent Protein Kinase II » (ou CaMKII) (Steiner *et al.*, 1990), la « Microtubule Affinity Regulating Kinase » (ou MARK) (Drewes *et al.*, 1997) et la « Protein Kinase C » (ou PKC) (Correas *et al.*, 1992).

Le groupe suivant correspond à la famille des « **glycogen protein kinases** ». Autrefois appartenant aux kinases PDPK, les « glycogen protein kinases » forment maintenant un groupe particulier. En effet, elles phosphorylent la protéine Tau sur des résidus sérines et thréonines. Cependant il a été décrit que ces acides aminés suivent parfois mais pas nécessairement une proline. Elles possèdent le motif de reconnaissance suivant (Ser-X-X-X-pSer ou Ser X-X-X-D/E). Ce groupe inclut notamment la glycogène synthétase 3 β (ou GSK 3 β) (Cho and Johnson, 2003). Comme 39 sur les 71 sites de phosphorylation de Tau peuvent être phosphorylés par la GSK3 β (soit environ 55 % des sites) cette enzyme est considérée comme une kinase de Tau importante.

Enfin, Tau peut également être phosphorylée sur ces **5 résidus tyrosines** (Lee *et al.*, 1998 ; Lebouvier *et al.*, 2008b), situés en position Y18 (Lee *et al.*, 2004), Y29, Y197 (Vega *et al.*, 2005), Y310 et Y394 (Derkinderen *et al.*, 2005). L'ensemble des enzymes permettant la phosphorylation de la protéine Tau sur ces résidus constitue le 4^{ème} et dernier groupe. Il comprend peu de protéines kinases spécifiques. Parmi elles, on retrouve, la kinase abelson (ou c-abl) (Derkinderen *et al.*, 2005) et les kinases de la famille Src. Cette famille regroupe les kinases Src (Lee, 2005), Lck (Williamson *et al.*, 2002), Syk (Lebouvier *et al.*, 2008a) et Fyn (Lee *et al.*, 2004).

I.3.1.2 / Phosphatases

Les enzymes phosphatases sont responsables de la déphosphorylation par hydrolyse du groupement phosphate des acides aminés. Les phosphatases qui peuvent déphosphoryler Tau appartiennent au groupe des phosphatases à sérines ou thréonines nommées «Phospho-Protein Phosphatases» (ou PPP). Ce groupe inclut notamment PP1, PP2A (Sontag *et al.*, 1996), PP2B et PP5 (Liu *et al.*, 2005), toutes capables de déphosphoryler Tau (Martin *et al.*, 2013). PP2A est la phosphatase majeure du cerveau humain dans les conditions physiologiques. Son activité représente pour 70 % environ de la déphosphorylation de Tau totale (Liu *et al.*, 2005).

I.3.1.3 / Autres acteurs de la phosphorylation

En plus de l'action directe des kinases et des phosphatases citées précédemment, la phosphorylation de Tau peut être modulée indirectement par l'action de la peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase Pin1 (Lu *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2000; Hamdane *et al.*, 2006). En effet, l'interaction entre Tau et Pin1 entraîne l'activation de la phosphatase PP2A qui favorise la déphosphorylation de Tau dans les neurones (Galas *et al.*, 2006).

I.3.2 / AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

La phosphorylation est la principale modification post-traductionnelle de la protéine Tau. Cependant, il faut savoir que Tau peut également faire l'objet de O- et de N-glycosylation, d'acétylation, de clivage, de nitration, d'ubiquitination, de glycation, de poly-amination et enfin de prolyl-isomérisation (Buée *et al.*, 2000 ; Sergeant *et al.*, 2008 ; Martin *et al.*, 2011).

I.4 / IMPACT DE LA PHOSPHORYLATION PHYSIOLOGIQUE DE TAU SUR SES DIFFÉRENTES FONCTIONS

La phosphorylation a des conséquences importantes sur les fonctions de Tau dans les différents compartiments cellulaires. L'impact de la phosphorylation physiologique de Tau sur ses rôles fait donc l'objet du chapitre suivant.

I.4.1 / PHOSPHORYLATION DE TAU ET STABILISATION MICROTUBULAIRE

La phosphorylation de Tau régule de façon importante sa liaison aux microtubules et en conséquence l'organisation du réseau microtubulaire neuronal. En effet, Lindwall et Cole ont montré dans une étude *in vitro* que lorsque la protéine Tau est majoritairement déphosphorylée cela favorise la stabilité des faisceaux de microtubules (Lindwall and Cole, 1984).

De plus, il a été montré *in vitro* que la phosphorylation d'un seul épitope particulier de la protéine Tau suffit pour avoir une incidence importante sur la stabilité microtubulaire. C'est notamment le cas de la phosphorylation de la sérine 262 (Biernat *et al*, 1993) qui, à elle seule, diminue très fortement cette interaction. C'est le cas également de la phosphorylation de la sérine 214 (Illenberger *et al*, 1998). De plus, en 2004, Cho et Johnson ont montré que la phosphorylation de la thréonine 231 possède également un rôle important dans la régulation de l'interaction de Tau avec les microtubules (Cho and Johnson, 2004). En effet, elle diminue à la fois son habilité à se lier au réseau microtubulaire mais aussi diminue sa capacité à le stabiliser. De façon intéressante, la thréonine 231 est une cible privilégiée de la kinase GSK 3 β (Goedert *et al*, 1994). Cette enzyme possède donc très probablement une fonction importante dans la régulation du réseau microtubulaire.

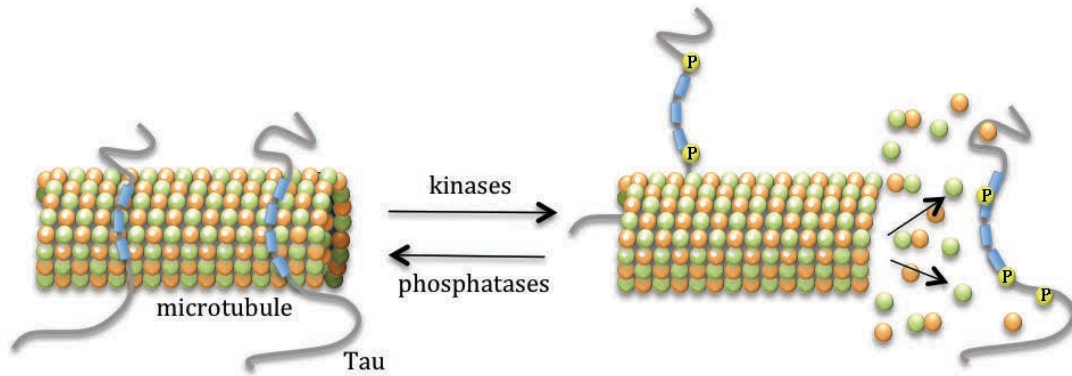


Figure 6 : Phosphorylation de Tau et dynamique microtubulaire. L'état de phosphorylation de Tau est impliqué dans la régulation de sa liaison aux microtubules. Les formes phosphorylées de Tau présentent une capacité moindre à lier les microtubules. L'équilibre de la dynamique microtubulaire fait donc l'objet d'une régulation complexe faisant intervenir des kinases et des phosphatases.

I.4.2 / PHOSPHORYLATION DE TAU ET TRANSPORT AXONAL

Dans une lignée cellulaire neuronale murine, lorsque Tau est phosphorylée par la kinase GSK 3 β , une diminution du transport antérograde a été observée. Le traitement de ces cellules par du lithium, un inhibiteur de l'enzyme GSK 3 β , prévient l'altération du transport axonal (Tatebayashi, 2004). L'état de phosphorylation de Tau est donc également un élément important pour le transport axonal de molécules.

Le domaine PAD de la protéine Tau active un signal de transduction impliquant la phosphatase PP1 (proteïn phosphatase 1). A son tour, cette protéine active l'enzyme GSK 3 β qui phosphoryle la kinésine entraînant le détachement de son cargo (LaPointe *et al.*, 2009). L'activation de cette cascade de transduction nécessite la disponibilité de la partie amino-terminale de la protéine Tau qui contient un domaine d'activation des phosphatases nommé PAD (pour le terme anglais « phosphatase-activating domain ») (Kanaan *et al.*, 2012). Ainsi ce domaine PAD, lorsqu'il est exposé, possède un effet délétère sur le transport axonal (Figure n°7 B).

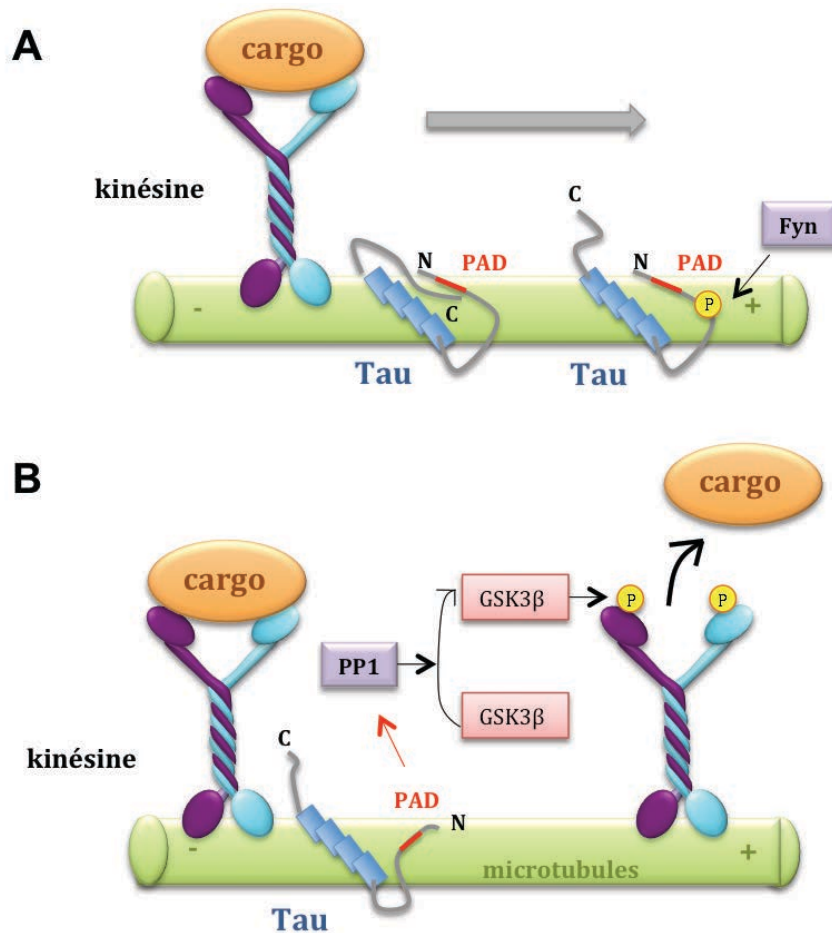


Figure 7 : Impact de la phosphorylation de la partie amino-terminale de Tau sur le transport axonal. (A) : Le transport par les kinésines est actif. Le domaine PAD est inaccessible par la conformation particulière de Tau ou par la phosphorylation de la tyrosine 18. Il ne peut activer la cascade PP1- GSK 3 β . **(B) :** La protéine cargo est libérée par la kinésine. Le domaine PAD est accessible et peut activer la cascade PP1- GSK3 β . GSK3 β va phosphoryler la kinésine, ce qui détache le cargo (Adapté de Kanaan *et al.*, 2012)

Le site de phosphorylation Y18 est situé dans le domaine PAD de la partie amino-terminale de Tau. Cet épitope est un substrat pour une kinase de la famille Src, la protéine Fyn (Lee *et al.*, 2004). Kanaan et collaborateurs ont étudié l'impact de la phosphorylation de ce site sur la modulation du transport axonal par Tau. Pour ce faire une protéine Tau mutée mimant la phosphorylation de ce site a été utilisée. La tyrosine en position 18 a été mutée en acide glutamique afin de respecter la charge négative et la conformation de la phosphorylation. Les auteurs ont montré que la phosphorylation de

ce site prévient l'effet délétère du domaine PAD sur le transport axonal (Kanaan *et al.*, 2012) (Figure n°7 A).

I.4.3 / PHOSPHORYLATION PHYSIOLOGIQUE DE TAU ET LIAISON À LA MEMBRANE PLASMIQUE

Tau est capable de se lier à la membrane plasmique via son domaine amino-terminal (Brandt *et al.*, 1995). Cette interaction est régulée par son état de phosphorylation. De façon globale, la phosphorylation de Tau inhibe sa liaison avec la membrane (Ekinci and Shea, 2000; Maas *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2008). L'étude d'Arrasate et collaborateurs montre que la protéine Tau liée à la membrane est détectée par l'anticorps Tau 1. Ce dernier reconnaît des formes de Tau déphosphorylée au niveau des sérines 195, 198, 199 et 202. La protéine Tau membranaire n'est pas détectée avec l'anticorps AT8 reconnaissant la sérine 202 et la thréonine 205 phosphorylées (Arrasate *et al.*, 2000). De façon globale, la phosphorylation de Tau, en la détachant de la membrane, aurait un effet inhibiteur sur son rôle dans la transduction de signaux au niveau des synapses.

I.4.4 / PROTÉINE TAU NUCLÉAIRE ET PHOSPHORYLATION

Peu d'études ont été menées sur la protéine Tau nucléaire et son état de phosphorylation dans le noyau.

Cependant, les premières études ayant mis en évidence l'existence de cette protéine Tau nucléaire ont été réalisées à l'aide de l'anticorps Tau 1. La protéine Tau nucléaire est donc au moins déphosphorylée sur les sites reconnus par cet anticorps (Loomis *et al.*, 1990 ; Brady *et al.*, 1995). Ceci a été confirmé dans une étude menée au laboratoire par Sultan et collaborateurs. Les auteurs montrent l'accumulation nucléaire de protéines Tau déphosphorylée sur les sites reconnus par l'anticorps Tau 1 en condition de stress hyperthermique dans des cultures primaires de cortex d'embryons de souris (Sultan *et al.*, 2011). Les thréonines 212 et 231 ne sont pas phosphorylées dans le noyau des

neurones dans ces conditions (anticorps anti-PT212 et AT180 de Tau) (Sultan *et al.*, 2011). Dans cette même étude, la protéine Tau nucléaire de tranches *ex-vivo* de souris soumises à un stress hyperthermique est phosphorylée sur les sérines 262 et 356 (anticorps 12 E 8).

D'autres études sont par conséquent nécessaires afin de pouvoir conclure de façon plus complète sur l'état de phosphorylation de Tau dans le noyau des neurones.

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

Cependant, Tau, en interagissant avec des éléments de la membrane plasmique, intervient probablement également dans la régulation de voies de signalisation. Dans le noyau, la protéine Tau permet de protéger l'ADN neuronal des dommages induits par un stress.

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

II / LES TAUOPATHIES

Le temps conduit inéluctablement au vieillissement. Ce dernier représente le principal facteur de risque de développer des maladies neurodégénératives. Avec l'accroissement de la longévité, le nombre de patients atteints de démences a conjointement augmenté. Parmi les différentes maladies neurodégénératives, nous allons nous focaliser sur les « Tauopathies » et plus particulièrement sur la maladie d'Alzheimer (MA).

II.1 / CONCEPT DE TAUOPATHIES

Il existe une vingtaine de Tauopathies différentes (Sergeant *et al.*, 2008; Spillantini and Goedert, 2013) (tableau n° 1). Leur point commun est la présence d'agrégats intracellulaires formés de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée. Bien que présents dans toutes les Tauopathies, ces agrégats possèdent différentes localisations cellulaires en fonction de la maladie considérée. En effet, ils peuvent être présents dans les neurones, les astrocytes ou bien encore les oligodendrocytes (Tableau n°1).

Classe de Tauopathies	Tauopathies	Cellules	Références
Classe 1	Maladie d'Alzheimer	Neurones	Sergeant <i>et al</i> , 2005
	Syndrome de Down	Neurones	Hof <i>et al</i> , 1995
	Parkinsonisme Post-encéphalique	Neurones et prolongements astrocytaires	Buée-Scherrer <i>et al</i> , 1996
	Sclérose latérale amyotrophique de l'île de Guam	Neurones	Buée-Scherrer <i>et al</i> , 1995
	Atrophie multisystémique	Oligodendrocytes	
	Maladie de Niemann Pick de type C	Neurones	Love <i>et al</i> , 1995
	Démence pugilistique	Neurones	Hof <i>et al</i> , 1992
	Panencéphalite sclérosante subaigüe	Neurones et oligodendrocytes	
	Neuroferritinopathie (Maladie d'Hallenvorden-Spatz)	Neurones	Zarranz <i>et al</i> , 2006
	Maladie de Gerstmann-Straussler-Scheinker	Neurones	Tranchant <i>et al</i> , 1997
Classe 1, 2 ou 3	FTDP-17	Neurones, oligodendrocytes, astrocytes (selon la mutation)	Hutton <i>et al</i> , 1998 Gasparini <i>et al</i> , 2007
Classe 2	Démence à grains argyrophiles	Neurones, oligodendrocytes, astrocytes	Tolnay <i>et al</i> , 2002
	Paralysie supranucléaire progressive	Neurones et astrocytes	Sergeant <i>et al</i> , 1999
	Dégénérescence cortico-basale	Neurones pyramidaux, astrocytes, oligodendrocytes	Sergeant <i>et al</i> , 1999

Classe 3	Maladie de Pick	Neurones granulaires	Delacourte <i>et al</i> , 1996
Classe 4	Dystrophie myotonique de type I et de type II	Neurones et astrocytes	Sergeant <i>et al</i> , 2001

Tableau 1 : Classification des principales Tauopathies. Répartition en fonction des différentes classes biochimiques et des cellules possédant les agrégats de protéine Tau.

Les agrégats intracellulaires de protéine Tau diffèrent également du point de vue des isoformes et de l'état de la phosphorylation de la protéine Tau agrégée. Ceci modifie le poids moléculaire apparent de Tau après migration en électrophorèse SDS-PAGE monodimensionnelle. Ainsi, 4 classes distinctes de Tauopathies ont été identifiées en fonction du profil biochimique des agrégats de Tau (pour revue Sergeant *et al*, 2005) (Figure n°8).

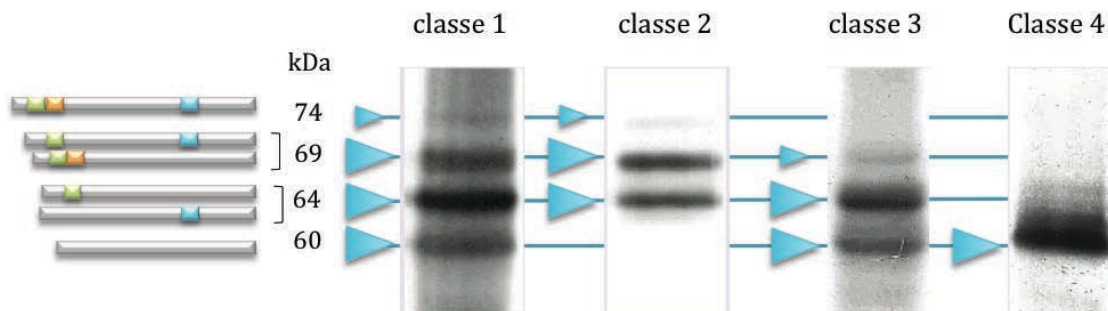


Figure 8 : Classification biochimique des Tauopathies. Tissus de cerveaux humains de patients atteints par différentes Tauopathies. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide et les protéines Tau pathologiques ont été révélées par immunoeempreintes en utilisant un anticorps phospho-dépendant (anticorps monoclonal AD2 reconnaissant la protéine Tau lorsqu'elle est phosphorylée sur les sérines 396 et 404 de l'isoforme la plus longue), 4 profils électrophorétiques différents des protéines Tau pathologiques sont observés. Ils sont composés de bandes pathologiques à 60, 64, 69 et 74 kDa (Adapté de Sergeant *et al*, 2005).

- **Classe 1** : Agrégation de toutes les formes de Tau

Cette classe est caractérisée par un profil électrophorétique représentant 4 bandes à 60,

64, 69 et 74 kDa. Les 6 isoformes de Tau y sont retrouvées. La bande à 74 kDa est composée de l'isoforme de Tau la plus longue (isoforme 2⁺ 3⁺ 10⁺). La bande à 69 kDa correspond aux isoformes 2⁺ 3⁺ 10⁻ et 2⁺ 3⁻ 10⁺ et celle à 64 kDa aux isoformes 2⁺ 3⁻ 10⁻ et 2⁻ 3⁻ 10⁺. Enfin la dernière bande la plus légère correspond à l'isoforme la plus courte de Tau, l'isoforme fœtale (isoforme 2⁻ 3⁻ 10⁻) (Sergeant *et al.*, 1997). Cette classe est la plus vaste et comprend la majorité des Tauopathies dont la MA.

- **Classe 2** : Agrégation des isoformes incluant l'exon 10

La classe 2 est caractérisée par un doublet pathologique migrant à 64 et 69 kDa. Ces bandes correspondent aux isoformes de Tau incluant et excluant l'exon 10. Cette classe regroupe notamment la paralysie supranucléaire progressive, la démence cortico-basale et la démence à grains argyrophiles (Ksiezak-Reding *et al.*, 1994; Sergeant *et al.*, 1999) caractérisées par une augmentation du ratio Tau 4R / Tau 3R.

- **Classe 3** : Agrégation des isoformes excluant l'exon 10

Le profil biochimique de la classe 3 est un doublet pathologique à 60 et 64 kDa. Ce doublet correspond majoritairement aux isoformes de Tau 3R. Cette classe regroupe certaines démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17 (FTDP-17) et la maladie de Pick (Sergeant *et al.*, 1997).

- **Classe 4** : Agrégation principalement de l'isoforme excluant les exons 2, 3 et 10

Cette classe est représentée par une seule maladie neurodégénérative, la dystrophie myotonique. Une bande majeure à 60 kDa correspondant aux agrégats de Tau est retrouvée. Ces agrégats sont majoritairement composés des isoformes excluant les exons 2 et 3 et partiellement l'exon 10 (Sergeant *et al.*, 2001).

Les agrégats de protéine Tau peuvent également prendre différents aspects histologiques en fonction de la maladie (figure n°9). Par exemple, dans la maladie d'Alzheimer, les agrégats forment des dégénérescences neurofibrillaires. Dans la maladie de Pick, ils constituent les corps de Pick et dans la démence cortico-basale, les touffes gliales (Hasegawa *et al.*, 1999).

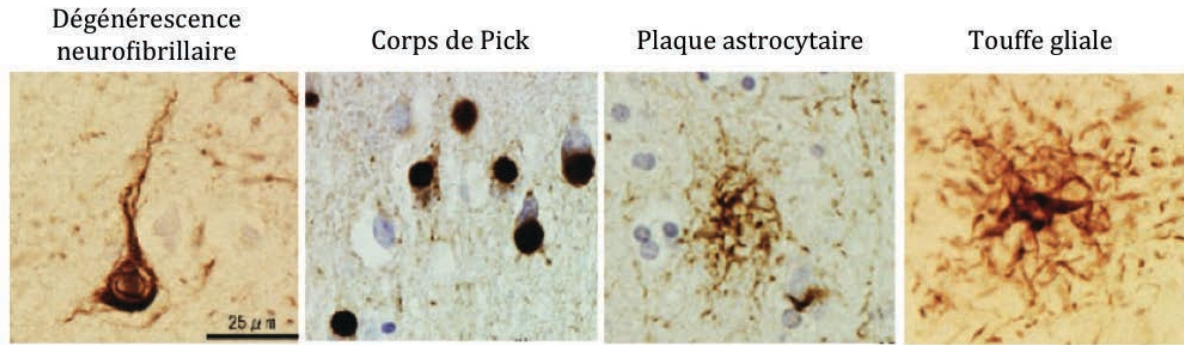


Figure 9 : Structure des agrégats de Tau dans certaines Tauopathies. De gauche à droite : dégénérescence neurofibrillaire retrouvée notamment dans la maladie d’Alzheimer ; corps de Pick de la maladie de Pick ; plaque astrocytaire de la paralysie supranucléaire (PSP) ; touffe astrocytaire de la démence cortico-basale (DCB). Marquage histologique à l’aide de l’anticorps AT8 de Tau (Pser 202/ PThr205). (Adapté de Hasegawa *et al.*, 2006)

Les Tauopathies présentant une mutation sur le gène de Tau sont regroupées sous le terme de démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 ou FTDP-17.

II.2 / FTDP-17 : DES MUTATIONS DU GÈNE *MAPT* CONDUISANT À LA PATHOLOGIE TAU

Les FTDP-17 sont des maladies autosomiques dominantes caractérisées notamment par une importante atrophie corticale, une perte neuronale et une gliose. Il existe une grande variabilité entre les individus concernant l’étendue de la neuropathologie qui peut atteindre l’hippocampe, l’amygdale, le cortex enthorinal ou la substance noire (Spillantini *et al.*, 1998a). Malgré cette hétérogénéité, on retrouve dans toutes ces FTDP-17 des inclusions neuronales de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée (pour revue (Gasparini *et al.*, 2006)).

A ce jour, une quarantaine de mutations sur le gène de Tau ont été identifiées dans ces démences (Figure n°10). Ces mutations sont localisées principalement au niveau des exons 1, 9, 10, 11, 12 et 13 de *MAPT*. La majorité des mutations décrites se localisent donc dans les régions codantes de Tau et inclues des substitutions, délétions ou

mutations silencieuses. Des mutations au niveau de l'intron compris entre les exons 9 et 10 sont les plus fréquentes. La majorité des mutations localisées au niveau des régions exoniques se trouve au niveau de la région de liaison aux microtubules (exons compris entre le 9 et le 12) ou proche (exon 13). Deux mutations retrouvées au niveau de l'exon 1 ont aussi été décrites (Hasegawa *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2002). Les mutations de l'exon 10 affectent uniquement les formes à 4 domaines de répétitions de Tau. La principale conséquence des mutations retrouvées dans les régions introniques de Tau est de modifier des éléments impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif de Tau. Ceci entraîne un déséquilibre du ratio des différentes isoformes de Tau (Hutton *et al.*, 1998; Spillantini *et al.*, 1998b).

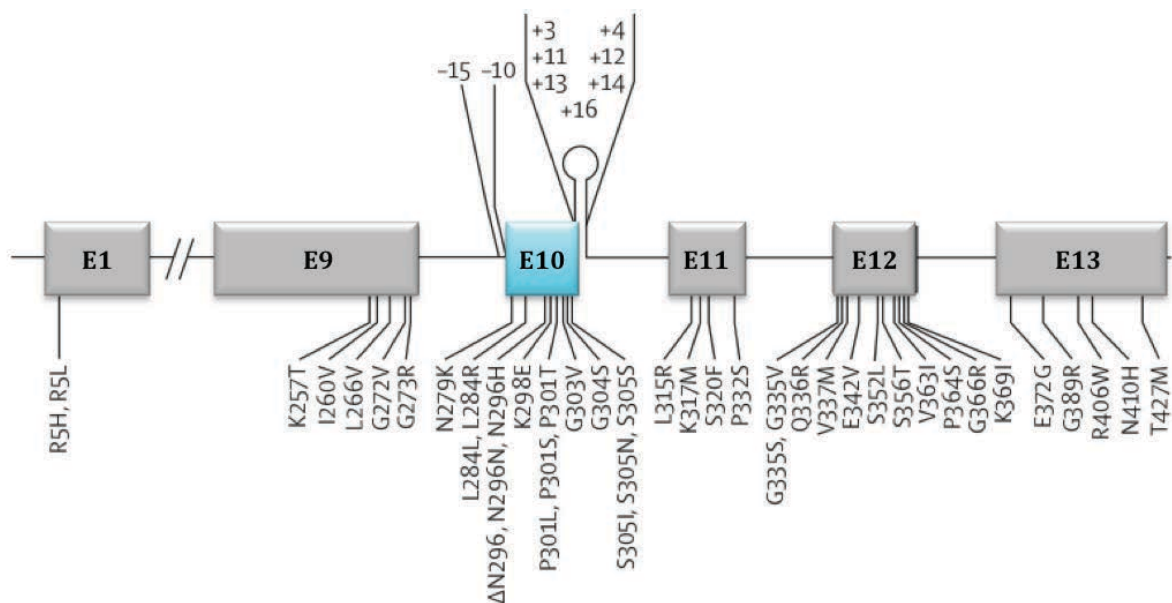


Figure 10 : Mutations du gène *MAPT*. Ces mutations sont à l'origine des démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17 (FTDP-17). Description de 42 mutations dans les régions codantes et 9 mutations dans les régions introniques encadrant l'exon 10 (Adapté de Goedert *et al.*, 2012).

Cependant, la majorité des démences sont sporadiques et la plus fréquemment rencontrée est la maladie d'Alzheimer. De plus, les formes génétiques de la MA ne sont jamais due à des mutations sur le gène de Tau.

II.3 / MALADIE D'ALZHEIMER

La maladie d'Alzheimer est caractérisée comme toutes les Tauopathies par la présence de filaments de protéines Tau hyper et anormalement phosphorylée. L'étude de la pathologie Tau permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de cette démence.

II.3.1 / GÉNÉRALITÉS

II.3.1.1 / Clinique

D'un point de vue clinique, le premier symptôme observé dans la maladie d'Alzheimer est souvent une perte de mémoire se manifestant initialement par des distractions mineures. Cette perte de mémoire s'accroît avec la progression de la maladie. Les souvenirs plus anciens sont cependant relativement préservés. L'atteinte neurologique s'étend par la suite aux cortex associatifs frontaux et temporo-pariétaux, se traduisant par des troubles cognitifs plus sévères (confusions, irritabilité, agressivité, troubles de l'humeur et des émotions, des fonctions exécutives et du langage) et la perte de la mémoire à long terme. La destruction des neurones se poursuit jusqu'à la perte des fonctions autonomes et la mort cellulaire.

I.3.1.2 / Cas génétiques

Moins de 1 % des cas de maladie d'Alzheimer sont des formes familiales. Elles sont caractérisées par des mutations autosomiques dominantes à pénétrance complète à

l'âge de 60 ans. Ces mutations sont observées dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la physiopathologie de la maladie. En 1991, la première mutation responsable de la MA a été découverte sur le gène de l'APP (amyloid precursor protein). D'autres mutations ont ensuite été découvertes sur ce même gène ainsi que sur les gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (Chartier-Harlin *et al.*, 1991; Mullan *et al.*, 1992; Tysoe *et al.*, 1998).

II.3.1.3 / Cas sporadiques

Le plus souvent, la MA apparaît de façon sporadique. Cependant, les origines des formes sporadiques de la MA sont encore à l'heure actuelle inconnues. Des facteurs de risque à la fois génétiques et environnementaux sont mis en jeu dans l'apparition de la MA. L'âge est le plus important. Compte tenu de l'augmentation toujours croissante de l'espérance de vie, cette démence est devenue aujourd'hui un problème majeur de santé publique.

II.3.1.3 / Facteurs de risque

Différents facteurs de risque génétiques ont été identifiés pour la MA. La présence de l'allèle 4 de l'apolipoprotéine E (APOE) est le facteur de risque le plus important (Genin *et al.*, 2011). D'autres facteurs de susceptibilité génétique ont été identifiés (Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009). Neuf gènes en plus de celui de l'APO E sont impliqués dans l'apparition de la MA (Ebbert *et al.*, 2013). C'est le cas de certains variants des gènes de la clusterine (CLU) et du récepteur 1 du complément (CR1) (Lambert *et al.*, 2009). C'est également le cas du gène *Bin1* codant pour 10 isoformes différentes dont l'une est impliquée dans les mécanismes d'endocytose (Kamboh *et al.*, 2012).

D'autres facteurs de risques environnementaux influencent l'apparition de la MA.. Outre le vieillissement, nous pouvons citer des facteurs d'origine vasculaire tels que les accidents vasculaires cérébraux ou les maladies cardiovasculaires (Salib and Hillier, 1997 ; de Toledo Ferraz Alves *et al.*, 2010). Les traumatismes crâniens (Sivanandam *et*

al, 2012) ou le syndrome métabolique (Kroner, 2009 ; Leboucher *et al.*, 2013) sont également des facteurs augmentant le risque de développer la MA.

II.3.2 / NEUROPATHOLOGIE

C'est au début du XX^{ème} siècle que le neuropsychiatre Aloïs Alzheimer examine Auguste Deter, qui sera la première patiente diagnostiquée avec une « démence présénile ». Elle présente à son arrivée des troubles de la mémoire, du langage et des hallucinations. Après le décès de sa patiente, le Dr. Alzheimer étudia son cerveau et identifia une importante atrophie. En effet, au niveau macroscopique, le cerveau des patients atteints de la MA révèle une atrophie cortico sous corticale. On observe également une augmentation du volume des ventricules et des sillons corticaux (Figure n°11). L'atrophie reflète en partie la perte neuronale chez les patients atteints de la MA et est particulièrement observée au niveau de l'hippocampe.

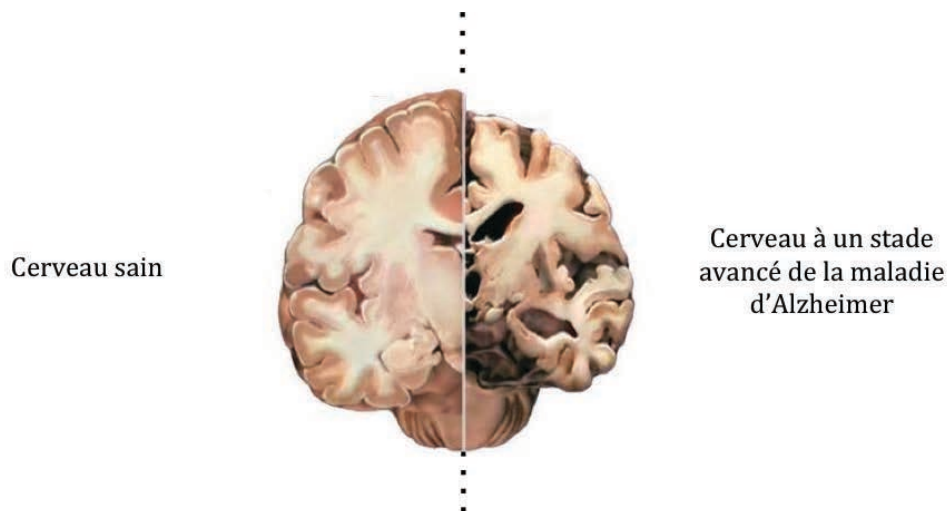


Figure 11 : Illustration de l'atrophie corticale observée dans la maladie d'Alzheimer. Cette illustration représente une coupe transversale du cerveau. Elle montre la conséquence de la disparition massive de cellules dans le cerveau à des stades avancés de la maladie. L'atrophie est particulièrement marquée au niveau de l'hippocampe et la taille des ventricules augmente.

Le Dr Alzheimer réalisa des imprégnations argentiques pour colorer des fines coupes du cerveau de A. Deter. A l'aide de cette technique, deux types de dépôts sont alors observés :

- **des dépôts extra-neuronaux**, qui s'avèreront être des plaques amyloïdes.
- **des dépôts intra-neuronaux** aujourd'hui appelés des enchevêtrements neurofibrillaires ou dégénérescences neurofibrillaires (Figure n°12).

A l'heure actuelle, nous savons que l'accumulation conjointe de ces deux types de dépôts dans le cerveau est la caractéristique anatomo-pathologique de la maladie d'Alzheimer.

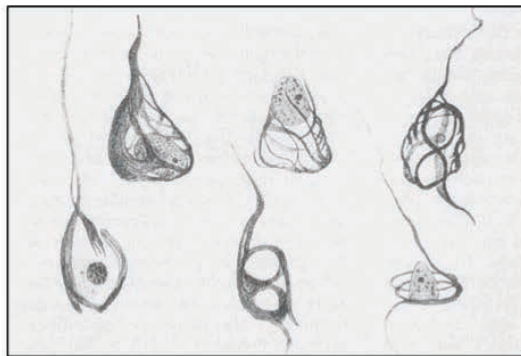


Figure 12 : Dessin original d'Aloïs Alzheimer. Ce dessin représente les dépôts intra-neuronaux que le Dr Alzheimer observa après imprégnation argentiques dans le cerveau de sa patiente Auguste Deter et qui s'avèrent être des enchevêtrements neurofibrillaires de protéines Tau.

II.3.2.1 / Plaques amyloïdes

Les plaques séniles sont des agrégats extracellulaires d'une petite protéine nommée peptide amyloïde (ou $A\beta$). Cette agrégation se fait sous la forme de feuillets plissés. Le précurseur de l' $A\beta$ est une protéine transmembranaire codée par le gène *APP* (*Amyloid Precursor Protein*) situé sur le chromosome 21 (Thinakaran and Koo, 2008). Son

épissage alternatif conduit à la production de plusieurs isoformes, dont la taille varie de 695 à 770 acides aminés.

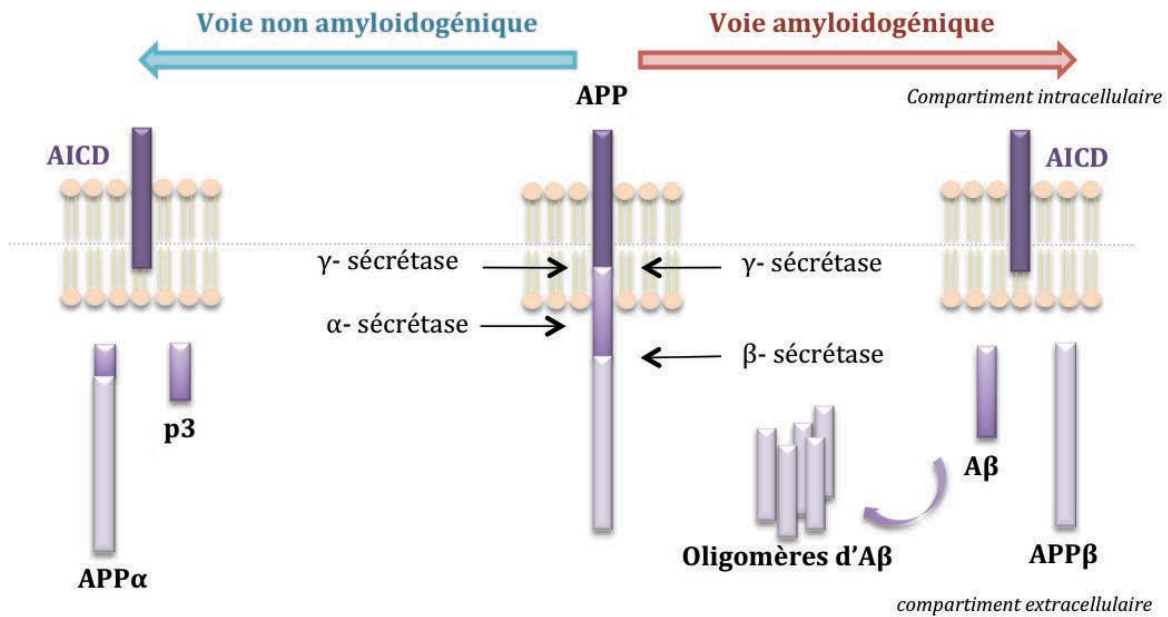


Figure 13 : Voies du métabolisme de l'APP. La protéolyse de l'APP peut se réaliser via deux voies distinctes. Une voie amyloïdogénique, qui après le clivage de l'APP par la β puis la γ sécrétase, génère un domaine extracellulaire nommé APP β , l'AICD (pour APP intracellular domain) et le peptide A β (de 39 à 42 acides aminés). Le peptide A β a une grande capacité d'agrégation et peut former des dimères, trimères et à un niveau plus élevé des oligomères, puis des plaques. Les plaques amyloïdes sont une des caractéristiques neuropathologiques de la MA. Dans la voie non amyloïdogénique, l'APP va être clivé par la γ puis l' α sécrétase. Cela va générer le domaine extracellulaire APP α , l'AICD et le fragment p3 dont la fonction est toujours inconnue (Adapté de Hicks *et al.*, 2012).

L'APP peut être clivée de manière séquentielle par deux enzymes, la β (ou BACE) et la γ sécrétase conduisant à la formation du peptide amyloïde. La γ -sécrétase est un complexe multi-protéique constitué de quatre partenaires : Un hétérodimère des présénilines PS1 et PS2, la nicastrine (Yu *et al.*, 2000 ; Edbauer *et al.*, 2002) et deux protéines membranaires, APh-1 et PEN-2 (Francis *et al.*, 2002).

L'activité protéolytique mettant en jeu la β et la γ sécrétase est appelée « voie amyloïdogénique » de maturation de l'APP. Les extrémités du peptide amyloïde peuvent

être clivées à différents sites et génèrent différentes formes d'A β . Le peptide A- β peut avoir une longueur comprise entre 36 à 43 acides aminés. Les formes majoritaires du peptide amyloïde sont l' A β 40 et l' A β 42. La γ sécrétase clive le peptide amyloïde au niveau de son 40^{ème} acide aminé libérant l'A β 40 ou au niveau de son 42^{ème} acide aminé, produisant ainsi le peptide A β 42. Ces deux formes d'A β , très proche d'un point de vue de leur séquence peptidique, possèdent néanmoins des propriétés agrégatives différentes. L'A β 42 présente un pouvoir agrégatif plus important que l' A β 40 (Burdick *et al.*, 1997). Dans la MA, les formes A β 42 sont généralement augmentées de manière sélective conduisant à une forte agrégation (Selkoe, 2001).

Il existe également une « voie non amyloïdogénique » de maturation de l'APP. L'enzyme α -sécrétase clive l'APP au milieu de la séquence du peptide amyloïde, prévenant la formation de ce dernier. Plusieurs protéines possédant une activité α -sécrétase ont été décrites, en particulier des protéines de la famille ADAM (Asai *et al.*, 2003). (Figure n°13).

II.3.2.2 / Dégénérescences neurofibrillaires

Dans la MA, les protéines Tau agrégées s'organisent en filaments appariés en hélice que l'on retrouve dans le corps cellulaire du neurone mais aussi dans ses prolongements (axone et dendrites) et forment les dégénérescences neurofibrillaires.

La propagation de la DNF dans la MA est fortement corrélée avec l'évolution des signes cliniques et la sévérité de la maladie (Arriagada *et al.*, 1992). L'évolution des lésions a été caractérisée dès 1991 (Braak and Braak, 1991). Une caractérisation plus fine réalisée en 1999 permet de distinguer 10 stades distincts correspondants aux différentes régions cérébrales touchées successivement dans la maladie d'Alzheimer (Delacourte *et al.*, 1999) (Figure n°14). La pathologie Tau se répand de manière stéréotypée et séquentielle au sein des différentes structures cérébrales.

Récemment, il a été montré que la première région atteinte par la pathologie Tau est le *locus coeruleus* (Braak and Del Tredici, 2011). Cette découverte renforce l'hypothèse de la progression de la pathologie Tau via des voies neuro-anatomiques. En effet, le *locus coeruleus* possède des axones qui projettent au niveau du cortex trans-enthorinal, la

deuxième région touchée par la pathologie.

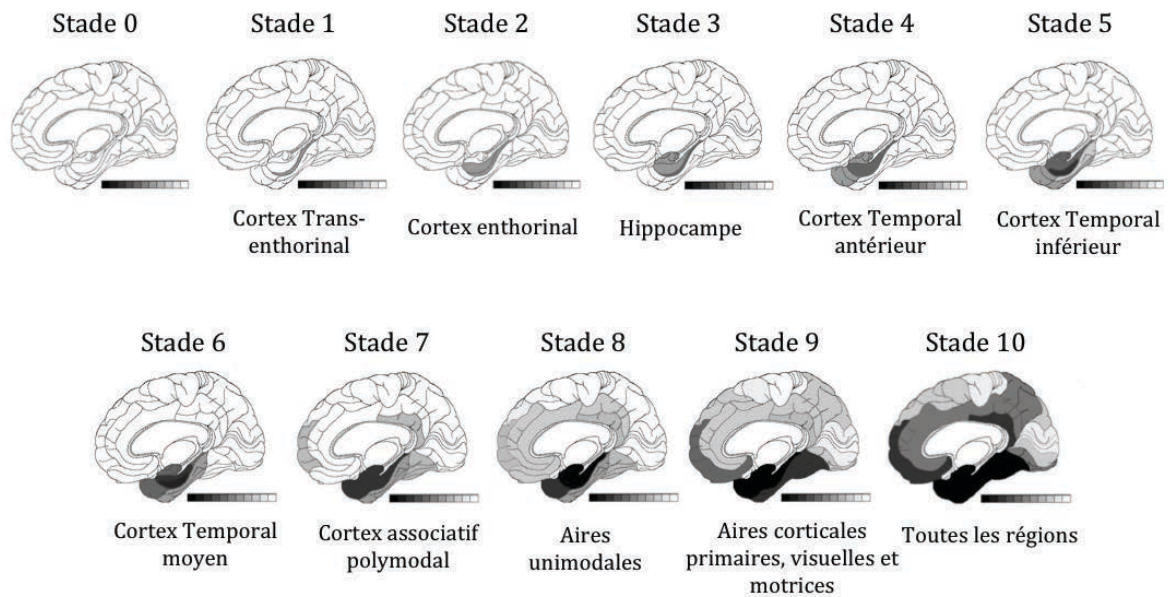


Figure 14 : progression cérébrale de la DNF au cours de la maladie d'Alzheimer. Les premières lésions apparaissent dans le cortex trans-enthorinal et la région hippocampique puis s'étend progressivement à l'ensemble du cerveau (Adapté de Delacourte *et al*, 1999).

II.3.3 / L'HIPPOCAMPE

L'une des premières régions atteintes par la pathologie Tau dans la maladie d'Alzheimer après le *locus coeruleus* est l'hippocampe. C'est une structure anatomique sous-corticale qui doit son nom à sa forme particulière rappelant l'animal marin du même nom (Figure n°15).

C'est une structure paire, présente dans chacun des hémisphères cérébraux. Chaque hippocampe est constitué du gyrus dentelé (ou denté) et de la corne d'Ammon (CA) (Figure n°16). Il fait partie d'un ensemble plus vaste nommé « formation hippocampique », constituée de l'hippocampe au sens strict en association avec les structures para-hippocampiques que sont le cortex enthorinal et le subiculum.



Figure 15 Comparaison, par le neuroscientifique hongrois László Seress, d'une préparation d'un hippocampe et d'un fornix humain avec un hippocampe (animal) (1980).

La corne d'Ammon peut être divisée en trois parties appelées CA1, CA2 et CA3. Différents types de cellules y sont présentes. Les principaux neurones localisés au niveau de la corne d'Ammon sont les neurones pyramidaux. Ils représentent environ 90% des neurones. Ces cellules sont des neurones excitateurs utilisant le glutamate comme neurotransmetteur. Ils possèdent une taille variable et sont plus larges dans la CA2 et la CA3 par rapport à ceux de la CA1.

Dans le gyrus dentelé, les principaux neurones sont des neurones granulaires. Ces neurones excitateurs possèdent une forme ronde et sont plus petits que les neurones pyramidaux. Ils forment une couche très dense de neurones. Environ 12% des neurones de l'hippocampe sont des cellules dites « non-pyramidales », c'est à dire ne sont ni des neurones granulaires ni des neurones pyramidaux (Benes et al., 1998). La plupart de ces cellules sont des interneurones gabaergiques. Ils exercent donc une action inhibitrice sur les réseaux neuronaux les avoisinant. Plusieurs de ces neurones peuvent également contenir des neuropeptides comme la cholécystokinine, le VIP (vasoactive intestinal peptide) ou encore la substance P (Pawelzik *et al.*, 2002). En plus des neurones, des cellules gliales sont retrouvées dans l'hippocampe : des astrocytes, des oligodendrocytes et de la microglie.

L'hippocampe est caractérisé par une boucle neuronale trisynaptique. Ce circuit neuronal est constitué tout d'abord des « fibres perforantes », axones provenant du cortex enthorinal et projetant directement sur les cellules granulaires du gyrus dentelé.

Cette voie constitue la voie d'entrée de l'information de l'hippocampe. Le gyrus dentelé envoie ensuite ses axones, qui constituent les « fibres moussues » vers les cellules pyramidales de la zone CA3 de la corne d'Ammon. Les axones de ces cellules se projettent sur les cellules pyramidales de la CA1 et cette voie est appelée « collatérale de Schaeffer ». Enfin, les axones des neurones de la CA1 envoient leurs axones au niveau du subiculum ou du cortex enthorinal. Ce circuit trisynaptique correspond aux principales voies retrouvées au sein de l'hippocampe (Figure n°16).

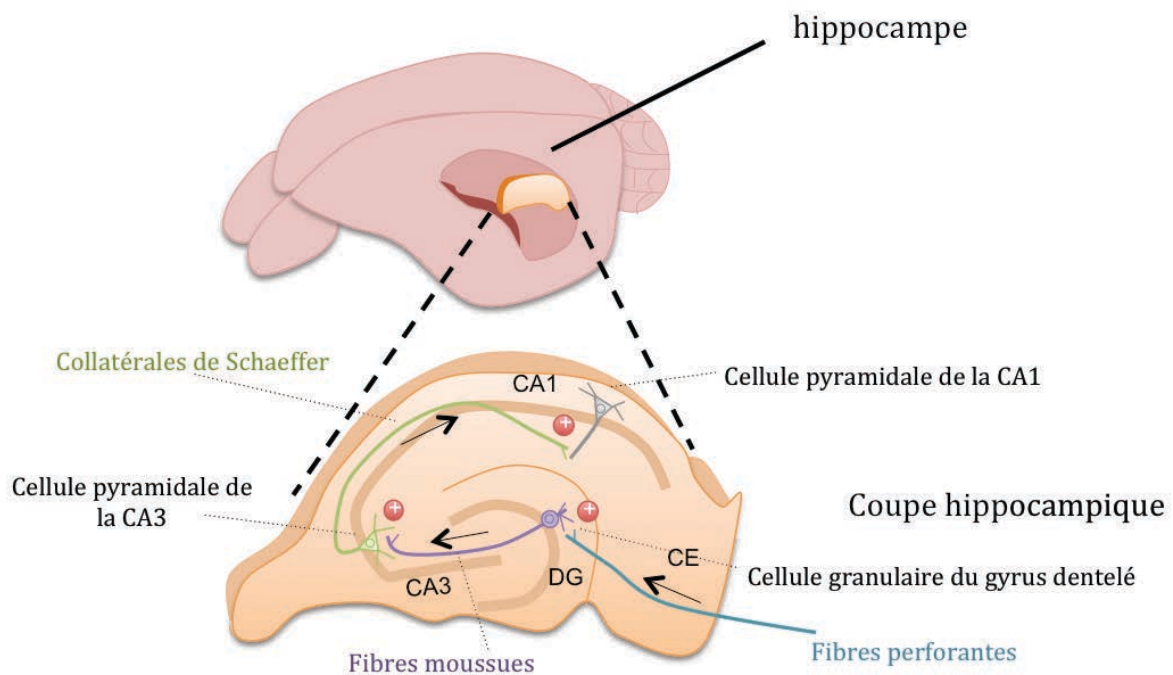


Figure 16 : Emplacement de l'hippocampe dans le cerveau de souris et description générale de la boucle trisynaptique. Visualisation d'une coupe d'hippocampe tel qu'elle apparaîtrait *in situ*. Chaque coupe inclut une portion de cortex enthorinal (CE), de gyrus dentelé (DG) de CA1, CA2 et CA3 de la Corne d'Ammon. Les lignes représentent les projections axonales. (Adapté de Wojtowicz, 2011)

La perte de mémoire est l'un des tous premiers symptômes observés chez les patients atteints de la MA. L'hippocampe est une structure essentielle à cette fonction cognitive. Son importance dans les phénomènes mnésiques a notamment été mise en évidence par des approches lésionnelles chez l'Homme (Zola-Morgan *et al.*, 1986; Corkin *et al.*, 1997) et dans des modèles animaux (Zola-Morgan *et al.*, 1992 ; Moser *et al.*, 1993 ; Moser *et al.*, 1995).

Toutes les Tauopathies sont caractérisées par le dépôt d'agrégats intracellulaires de protéine Tau dans le système nerveux central. Ces lésions conduisent, à terme, à une dégénérescence des cellules cérébrales. Ceci mène chez les patients à l'apparition de différents troubles cognitifs et comportementaux. Bien que toutes ces maladies mettent en jeu la même protéine, elles diffèrent par des tableaux cliniques divers ainsi que des particularités biochimiques et génétiques distinctes.

III / AGRÉGATION DE LA PROTÉINE TAU

Dans les conditions pathologiques, la protéine Tau est retrouvée sous une forme agrégée en feuillets plissés β . Elucider les mécanismes impliqués dans son agrégation est essentiel afin de comprendre l'apparition de la pathologie. Nous nous intéresserons aux formes agrégées insolubles, caractéristiques des Tauopathies, mais également aux petits oligomères solubles de Tau qui sont de plus en plus décrits comme des intermédiaires toxiques de l'agrégation.

III.1 / STRUCTURE ET MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES IMPLIQUÉES DANS L'AGRÉGATION DE TAU

La protéine Tau est une molécule flexible qui ne possède pas de conformation particulière lorsqu'elle est en solution. Cependant, des études ont montré que les séquences en acides aminés ²⁷⁵VQJINK₂₈₀ et ³⁰⁶VQJVYK₃₁₁, respectivement situées dans le domaine de répétition R2 et R3 de Tau, possédaient des propriétés pro-agrégatives (Bergen *et al.*, 2000). Les agrégats de Tau intracellulaires sont la caractéristique commune des Tauopathies.

III.1.1 / PHOSPHORYLATION ANORMALE ET AGRÉGATION DE TAU

Différentes modifications post-traductionnelles peuvent également être impliquées dans les phénomènes d'agrégation de Tau. La principale modification est la phosphorylation, régulée par de nombreuses kinases et phosphatases (*cf* chapitre I.3). En conditions pathologiques, les phénomènes de phosphorylation sont dérégulés et la protéine Tau est hyper et anormalement phosphorylée. L'hyperphosphorylation correspond à une

augmentation du nombre de groupement phosphate sur des sites normalement phosphorylés. La phosphorylation anormale correspond à des épitopes de la protéine Tau phosphorylés dépourvus de ce motif en condition physiologique. Ces modifications de phosphorylation perturbent l'équilibre entre les protéines Tau liées aux microtubules et celles libres dans le cytosol. En effet, l'augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau favorise son détachement des microtubules (Sun and Gamblin, 2009) augmentant le pool de protéines Tau libres.

Dans la maladie d'Alzheimer 45 sites de phosphorylation ont été identifiés sur les 85 sites potentiels. Ces phosphorylations se situent principalement au niveau de la région riche en proline et les régions encadrant les domaines de répétitions aux microtubules (Figure n° 17).

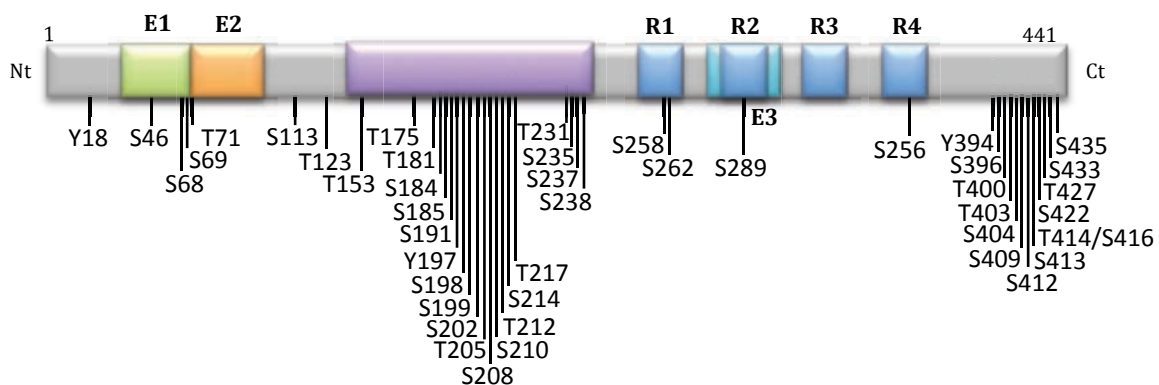


Figure 17 : Les différents sites de phosphorylation des protéines Tau impliqués dans la maladie d'Alzheimer (représentés sur l'isoforme la plus longue). Ils sont principalement concentrés au niveau du domaine riche en proline et à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine Tau, deux régions encadrant le domaine de liaison aux microtubules.

Ces protéines Tau cytoplasmiques hyper et anormalement phosphorylées adoptent alors une conformation tridimensionnelle favorisant leur agrégation (Daly *et al.*, 2000). Certains anticorps reconnaissent spécifiquement des conformations particulières pathologiques de la protéine Tau. C'est le cas des anticorps Alz50 (Carmel *et al.*, 1996) et MC1 (Weaver *et al.*, 2000).

III.1.2 / AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES ET AGRÉGATS DE TAU

D'autres modifications post-traductionnelles sont impliquées dans l'agrégation de la protéine Tau. C'est le cas notamment du clivage. En effet, *in vitro*, des fragments de Tau clivés par la caspase 3 montrent une propension plus grande à former des agrégats (Binder *et al.*, 2005) en présence de GSK 3 β (Cho and Johnson, 2003). De plus, dans un modèle murin, l'expression de protéines Tau tronquées induit la formation de dégénérescence neurofibrillaire (Zilka *et al.*, 2006). La nitration et l'oxydation de Tau semblent également influencer sa polymérisation (Reynolds *et al.*, 2005) ainsi que l'ubiquitination (Riederer *et al.*, 2009) et la N-glycosylation (Sato *et al.*, 2001).

III.1.3 / MUTATIONS ET AGRÉGATS DE TAU

Certaines mutations rencontrées dans les démences fronto-temporales liées au chromosome 17 sont également connues pour induire l'agrégation de Tau, particulièrement les mutations Δ K280 et P301L (Barghorn *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2008). Une hypothèse est que ces mutations, en diminuant l'affinité de Tau pour les microtubules (Hasegawa *et al.*, 1998), augmenterait le pool de protéines Tau au niveau du compartiment cytoplasmique ce qui favoriserait son agrégation.

III.2 / LES OLIGOMÈRES DE PROTÉINES TAU

Le terme « d'oligomère » désigne tout complexe de deux ou plusieurs molécules dans une structure multimérique. Des formes oligomériques de Tau ont été isolées pour la première fois en 1993 à partir de la fraction soluble provenant de cerveaux de patients atteints de la MA (Köpke *et al.*, 1993). Les oligomères de Tau peuvent être solubles, lorsqu'ils sont constitués d'un petit nombre de protéines Tau ou insolubles lorsqu'ils sont constitués d'un nombre élevé de molécules.

III.2.1 / MÉCANISMES D'OLIGOMÉRISEMENT DE TAU

III.2.1.1 / Généralités

Spontanément la protéine Tau physiologique ne s'oligomériser pas *in vitro*. Pour ce faire, elle a besoin de changements dans sa structure tels que ceux induits par certaines modifications post-traductionnelles (*cf* chapitre III.1).

Par ailleurs, pour induire *in vitro* la formation d'oligomères à partir de protéine Tau recombinante, un agent inducteur est toujours nécessaire. Cet agent inducteur peut être de nature très diverse tels que l'héparine (Goedert *et al.*, 1996), la taurine (Santa-María *et al.*, 2007), les acides gras polyinsaturés (Wilson and Binder, 1997), les phospholipides anioniques (Chirita *et al.*, 2003), l'ARN (Kampers *et al.*, 1996) ou bien encore l'ADN (Hikosou *et al.*, 2007). Tous ces agents inducteurs sont des polyanions, qui permettent le rapprochement de 2 protéines Tau dont les domaines de répétition sont chargés positivement.

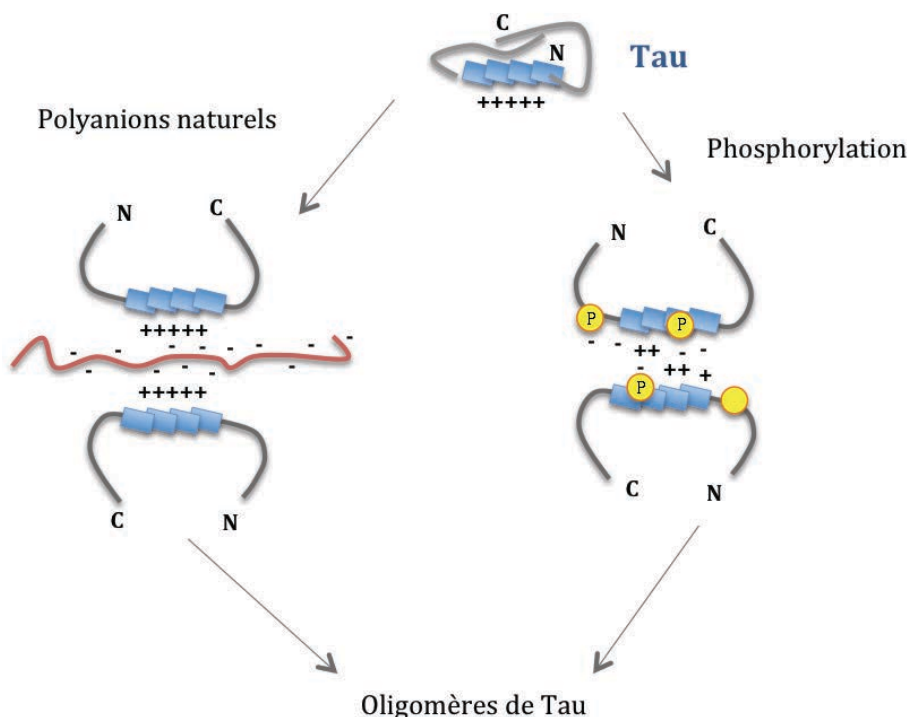


Figure 18 : Différents effecteurs de l'oligomérisation de Tau. L'interaction de Tau avec des polyanions naturels (héparines ; ARN) neutralise la charge positive de Tau et induirait son agrégation. La phosphorylation de Tau joue également un rôle important dans son oligomérisation (Adapté de Sluchanko *et al.*, 2011).

La protéine Tau pour s'oligomériser à toujours besoin d'un agent inducteur. A l'heure actuelle, aucun agent inducteur pour Tau n'a été mis en évidence dans la MA.

III.2.1.1 / Stress oxydant et oligomérisation de Tau

Le cerveau pour fonctionner a besoin d'une quantité très importante d'oxygène. Il ne représente environ que 2 % du poids du corps humain mais consomme à lui seul environ 20 % de l'oxygène présent dans l'organisme. Cet oxygène sera ensuite transformé en énergie par l'intermédiaire des mitochondries. La réaction permettant cette transformation engendre notamment la formation « d'espèces réactives de l'oxygène » (ou ROS pour Reactive Oxygen Species). Notre organisme en produit donc en permanence. Cependant, si ces ROS sont produites de manière trop importante ou si elles ne sont pas éliminées correctement, elles entraîneront des dégâts cellulaires importants. C'est ce que l'on appelle communément le stress oxydant. C'est pourquoi chaque cellule possède de nombreux mécanismes permettant de lutter contre les radicaux libres engendrés afin de maintenir un équilibre entre leur production et leur dégradation. Ces mécanismes sont finement régulés à l'aide d'enzymes anti-oxydantes telles que les superoxydes dismutases.

Le stress oxydant apparait dans de nombreux contextes pathologiques (Valko *et al.*, 2006) lorsque le système ne fait plus correctement face à la production de ROS. Les lésions oxydatives associées servent de marqueurs d'un environnement riche en ROS et sont de différentes natures. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent induire l'oxydation, la carbonylation, la nitration, la glycation ou encore la glycosylation des protéines au niveau de leurs résidus lysines. Les acides gras polyinsaturés qui composent notamment les lipides membranaires sont des cibles majeures des espèces réactives de l'oxygène. Ils entraînent leur peroxydation. L'ADN, qu'il soit mitochondrial ou nucléaire, peut également être la cible des ROS ainsi que les types différents d'ARN.

La quantité d'acides gras oxydés augmente dans le cerveau des patients atteints de la MA par l'action des ROS. Or, les acides gras oxydés facilitent la polymérisation de Tau *in vitro* (Gamblin *et al.*, 2000). Le stress oxydant favoriserait donc l'oligomérisation de Tau.

III.3 / OLIGOMÈRES SOLUBLES OU AGRÉGATS INSOLUBLES, QUELLES SONT LES FORMES TOXIQUES DE TAU ?

III.3.1 / LES AGRÉGATS INSOLUBLES DE TAU, LES FORMES INERTES

Les Tauopathies sont caractérisées par la présence d'agrégats insolubles de protéines Tau. Ces agrégats peuvent prendre différentes formes en fonction de la Tauopathie (*cf* chapitre II.1). De façon intéressante, ces agrégats se localisent dans les mêmes régions que la perte neuronale observée dans ces maladies neurodégénératives. Ils ont donc longtemps été considérés comme étant à l'origine de la mort des neurones.

Le rôle délétère des agrégats insolubles de Tau est aujourd'hui remis en cause. Différentes études suggèrent que les agrégats ne sont pas une cause suffisante au déclin cognitif et à la perte neuronale observés dans les Tauopathies. En effet, les neurones possédant des agrégats de protéines Tau peuvent survivre plusieurs décennies (Morsch *et al.*, 1999). Par ailleurs, différentes études utilisant des modèles murins de pathologie Tau ont montré que l'altération du transport axonal, les déficits mnésiques et la mort neuronale apparaissent bien avant la formation des agrégats insolubles (Spires *et al.*, 2006). Ces observations ont été confirmées dans des modèles murins inductibles. La suppression d'une forme mutée de Tau après l'installation de la pathologie prévient le déclin cognitif et la perte cellulaire malgré l'augmentation des fibres agrégées de protéines Tau (SantaCruz *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2011). De plus, dans un modèle de drosophile exprimant une protéine Tau mutée, Wittmann et collaborateurs montrent une dégénérescence corticale dans le cerveau des mouches en l'absence d'agrégats (Wittmann *et al.*, 2001).

Par ailleurs, plusieurs études suggèrent même un effet protecteur de ces agrégats dans les neurones. La formation des agrégats de Tau pourrait en effet, constituer une réponse protectrice contre le stress oxydant (Nunomura *et al.*, 2001). L'agrégation des protéines Tau interviendrait dans les mécanismes de détoxification mis en place par la cellule, tentant de contenir les espèces plus petites toxiques en les stockant sous des formes inertes (Bretteville and Planel, 2008; Brundin *et al.*, 2010).

Cependant bien que ces agrégats insolubles soient de plus en plus décrits comme des structures inertes voire protectrices, ils mènent, à terme à une perturbation physiologique de la cellule. En effet, leur accumulation au sein de la cellule laisse de moins en moins de place aux organelles intracellulaires. Des études de l'ultrastructure des neurones possédant des agrégats de Tau montrent une perte progressive du réticulum endoplasmique et des ribosomes. Par contre les mitochondries sont maintenues dans ces neurones. Ces observations suggèrent qu'en parallèle de l'agrégation de Tau, la synthèse protéique serait altérée. (Sumpter *et al*, 1986).

III.3.2 / DES OLIGOMÈRES INSOLUBLES DE TAU, LES FORMES TOXIQUES

Il apparaît dans la littérature que bien plus que les formes agrégées de Tau, ce sont des formes oligomériques solubles qui sont toxiques pour les neurones.

Dans un modèle murin inductible exprimant une forme de Tau « pro-agrégante », les animaux ont des problèmes mnésiques associés à une perte neuronale et de la plasticité synaptique. Cette forme « pro-agrégante » de Tau correspond aux 4 domaines de répétition d'une protéine Tau humaine avec la mutation $\Delta K280$ (observée dans certaines FTDP-17) (Mocanu *et al*, 2008). Dans le même modèle, si après avoir exprimé cette protéine Tau humaine cette expression est arrêtée, les souris retrouvent la mémoire et une densité synaptique plus importante après 4 mois (Mocanu *et al*, 2008). Dans un autre modèle murin, exprimant une protéine Tau mutée P301L humaine, les auteurs montrent une corrélation entre l'apparition d'oligomères solubles de Tau avec le déclin cognitif (Berger *et al.*, 2007; Sahara *et al.*, 2013) et confirme le caractère toxique des oligomères solubles de Tau. Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle transgénique de drosophiles exprimant une protéine Tau mutée. Une importante dégénérescence des neurones sans la formation de filaments de Tau hyperphosphorylée est observée. Cela suggère que la toxicité est médiée par des espèces solubles de Tau. De plus, l'expression de NMNAT (Nicotinamide MonoNucleotide (NAD) Adenylyl Transférase), une protéine neuroprotectrice, diminue de façon significative les déficits comportementaux et morphologiques associés à l'expression de la protéine Tau mutée. La NMNAT posséderait un rôle neuro-protecteur en diminuant de la concentration en oligomères solubles de Tau (Ali *et al.*, 2012). De même, dans le cerveau de patients

atteints de la MA, les formes oligomériques solubles de Tau apparaissent de façon précoces et initient très probablement la pathologie contrairement aux filaments de Tau hyperphosphorylée (Maeda *et al.*, 2007; Patterson *et al.*, 2011; Lasagna-Reeves *et al.*, 2012).

Les injections hippocampiques chez des souris sauvages de différentes formes de Tau (monomères, oligomères, fibrilles) permettent de mieux comprendre les mécanismes de neurotoxicité de Tau. Seule l'injection d'oligomères induit chez les souris injectées des problèmes mnésiques (Lasagna-Reeves *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, le développement d'outils permettant de discriminer les formes oligomériques de Tau est particulièrement intéressant. Deux anticorps reconnaissant des oligomères solubles de Tau ont été décrits dans la littérature. L. Binder *et collaborateurs* ont généré un anticorps qui reconnaît spécifiquement les dimères et les oligomères de Tau de petites tailles. Cet anticorps est nommé TOC1 pour « Tau Oligomeric Complex 1 » (Patterson *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2012). R. Kaye *et collaborateurs* ont développé l'anticorps T22 reconnaissant également des oligomères de Tau (Lasagna-Reeves *et al.*, 2012).

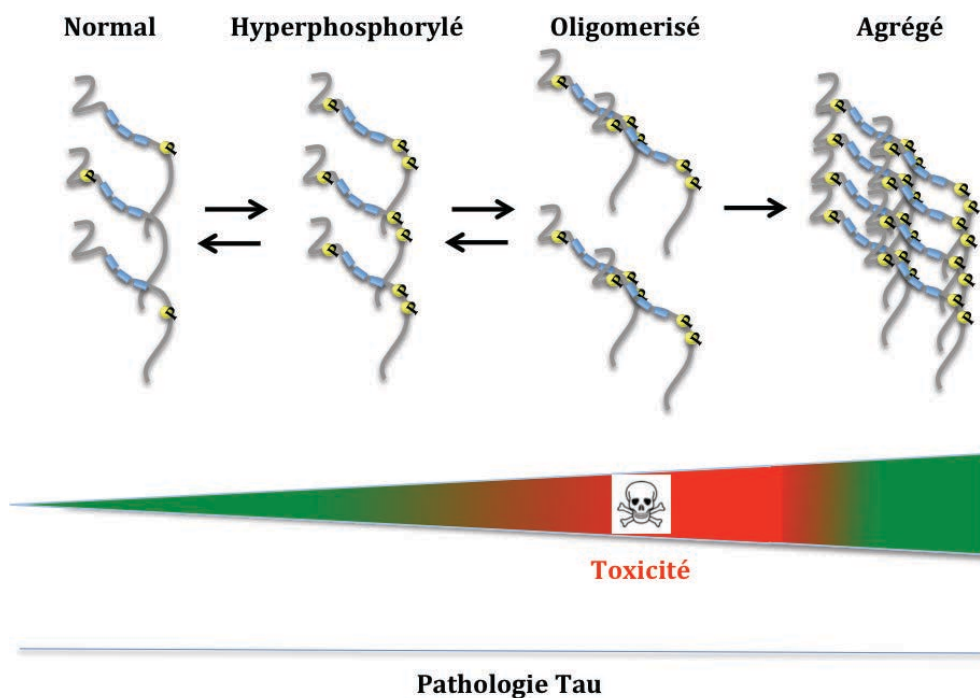


Figure 19 : Différentes espèces de Tau en fonction du temps. La toxicité des différentes espèces de Tau est représentée en rouge (Adapté de Breteville *et al.*, 2008).

En conclusion, toutes les Tauopathies présentent une hyperphosphorylation et une phosphorylation anormale de la protéine Tau menant à la formation d'agrégats. Ces agrégats de Tau présentent des caractéristiques spécifiques à chaque Tauopathie. Ces dernières années, il a été montré que ce sont des formes oligomériques solubles de la protéine Tau qui sont les formes toxiques et qui induisent la pathologie et non les agrégats insolubles qui pourraient même être neuroprotecteurs.

La compréhension de la formation et de l'action de ces oligomères solubles dans les neurones est donc essentielle à la compréhension de la pathologie Tau.

III.4 / IMPACT DE LA PATHOLOGIE TAU SUR SES DIFFÉRENTES FONCTIONS

La localisation de la protéine Tau est altérée dans les Tauopathies. Principalement axonale en condition physiologique, elle est notamment relocalisée dans le compartiment somato-dendritique dans la pathologie (Götz *et al.*, 1995). Les changements dans la localisation, la conformation et la phosphorylation de Tau observés dans la pathologie ont des conséquences importantes sur ses différentes fonctions biologiques.

III.4.1 / PATHOLOGIE TAU ET STABILISATION DES MICROTUBULES

La stabilisation du réseau microtubulaire est régulée dans les conditions physiologiques par l'équilibre entre la phosphorylation et la déphosphorylation de la protéine Tau. La phosphorylation pathologique de Tau a tendance à la détacher des microtubules. En effet, Sun et Gamblin ont montré que lorsque Tau est phosphorylée sur les acides aminés S199, S202, T205, T231, S396 et S404, sa liaison avec les microtubules était très diminuée (Sun and Gamblin, 2009). L'hyperphosphorylation de Tau induit également un plus grand espace entre les microtubules (Lee, 2005 ; Shahpasand *et al.*, 2012).

Globalement, la pathologie Tau entraîne donc une perte de sa fonction de MAP.

III.4.2 / TRANSPORT AXONAL ET PATHOLOGIE TAU

La protéine Tau est impliquée dans le transport axonal. Or, dans des souris exprimant une protéine Tau portant une mutation observée dans des FTDP-17, le transport axonal est diminué (Ittner *et al.*, 2008). La pathologie Tau entrainerait donc un déficit dans le transport axonal.

Un des mécanismes impliqués dans ce phénomène serait lié au domaine PAD de Tau. En effet, des études immuno-histochimiques menées dans des cerveaux de patients atteints de la MA indiquent qu'avec la progression de la pathologie, le domaine PAD de Tau est de plus en plus exposé (Kanaan *et al.*, 2011). Il est donc accessible aux enzymes telles que PP1 et active une cascade de signalisation menant à la libération par les kinésines de leur cargo (Figure n°20).

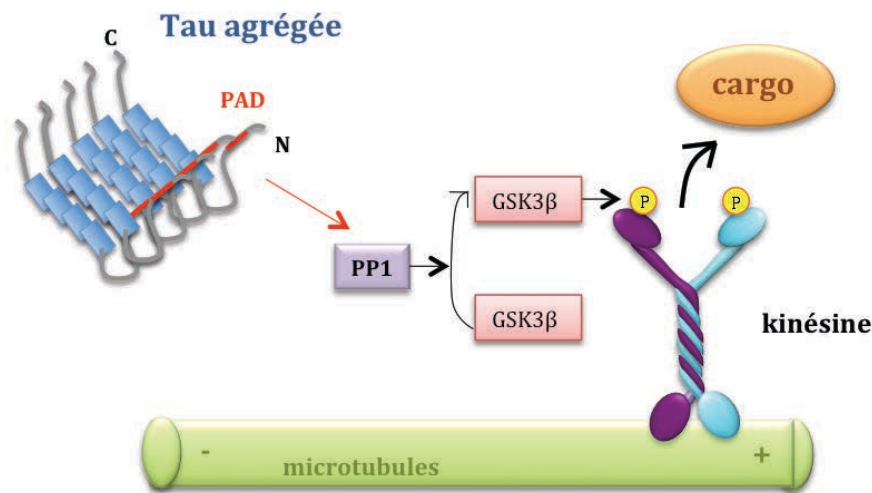


Figure 20 : Impact de l'agrégation de Tau sur le transport axonal. La protéine cargo est libérée par la kinésine. Le domaine PAD est accessible et peut activer la cascade PP1-GSK 3 β . GSK 3 β va phosphoryler la kinésine, ce qui détache le cargo (Adapté de Kanaan *et al.*, 2012).

III.4.3 / LIAISON À LA MEMBRANE PLASMIQUE ET PATHOLOGIE TAU

La phosphorylation de Tau inhibe sa liaison avec la membrane plasmique. En effet, Maas *et collaborateurs* montrent à l'aide de différents anticorps phospho-dépendants que les phosphorylations pathologiques au niveau des sites, Thr231, et Ser396/Ser404 diminuent l'interaction avec la membrane plasmique (Maas *et al.*, 2000). Tau est capable d'interagir avec les radeaux lipidiques qui sont des portions de la membrane plasmique riches en sphingolipides et cholestérol. Dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, Tau est toujours capable de se lier aux radeaux lipidiques et est sous une forme hyperphosphorylée au moins sur les sites Ser396/Ser404 (Kawarabayashi *et al.*, 2004). Toutefois, l'état de phosphorylation de la protéine Tau au niveau des radeaux lipidiques dans la pathologie n'est pas décrit dans la littérature.

III.4.4 / PATHOLOGIE TAU ET SIGNALISATION NEURONALE

Une plus grande quantité de Tau est observée au niveau des épines dendritiques de neurones hippocampiques provenant de cultures primaires de souris exprimant une protéine Tau mutée P301L (Hoover *et al.*, 2010). Une mutation de Tau peut donc entraîner sa relocalisation et son accumulation au niveau des épines.

La pathologie Tau module également la quantité de récepteurs au glutamate au niveau de l'élément post-synaptique. En effet, une quantité moindre de sous-unités des récepteurs glutamatergiques est observée à ce niveau dans des neurones hippocampiques de souris transgéniques P301L (GluA1, GluA2/3 et NR1) (Hoover *et al.*, 2010). Cela pourrait mener, avec le temps, à la déficience des épines dendritiques (McKinney, 2010). En effet, dans un modèle de souris exprimant une protéine Tau humaine mutée, le nombre d'épines associées aux synapses dans l'hippocampe est diminué significativement (Eckermann *et al.*, 2007).

Des souris exprimant la protéine Tau humaine en l'absence de protéine murine (souris hTau), accumulent avec le temps des oligomères de protéine Tau au sein de leur cerveau. On observe alors une délocalisation de la sous-unité NR2B des récepteurs glutamatergiques NMDA hors des épines dendritiques. De plus, le traitement de ces

souris à l'aide de curcumin permet l'éliminer des oligomères de protéines Tau et corrige la localisation de la sous-unité NR2B (Ma *et al*, 2013).

La pathologie Tau entraîne donc des déficits dans la signalisation synaptique notamment des récepteurs au glutamate.

III.4.5 / IMPACT SUR LA FONCTION NUCLÉAIRE DE TAU

Très peu d'études ont été menées sur l'impact de la pathologie Tau sur sa localisation et ses fonctions nucléaires. Cependant, des aberrations chromosomiques ont été observées dans les lymphocytes et fibroblastes de patients atteints de démence fronto-temporales avec la mutation P301L (Rossi *et al*, 2008; Rossi *et al*, 2013) Une mutation pathologique de Tau pourrait donc altérer sa fonction protectrice de l'ADN et engendrer l'accumulation de lésions.

Tau est une protéine possédant différentes localisations et fonctions au sein des neurones. La pathologie Tau affecte l'ensemble de ses fonctions. A ce titre, les Tauopathies résulteraient donc de l'altération des différents rôles neuronaux de la protéine Tau. Cependant, l'impact de la pathologie Tau sur sa fonction nucléaire est à ce jour toujours inconnu.

IV / DOMMAGES AUX ACIDES NUCLÉIQUES DANS LES TAUOPATHIES

C'est en 1869 que le médecin et biologiste suisse Miescher isole pour la première fois à partir de leucocytes de pus de plaies, une substance riche en phosphore qu'il nomma « nucléine » car provenant du noyau des cellules qu'il étudiait. Cette substance sera ensuite identifiée au début du XX^{ème} siècle comme étant l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cette macromolécule est un polymère dont l'unité de base est le nucléotide. Ses deux principales fonctions biologiques sont le support de l'information biologique et d'être le code permettant la synthèse protéique, essentielle au bon fonctionnement cellulaire. Le deuxième polynucléotide biologique présent au sein des cellules est l'acide ribonucléique (ARN), servant d'effecteur de l'expression de l'ADN en peptides et protéines. Les ARN peuvent être divisés en deux catégories majeures : les ARN messagers (ARNm) ou codants, les ARN non codants dont tels que les ARN de transfert (ARNt) et les ARN ribosomiaux (ARNr). Les neurones, cellules post-mitotiques, ne se divisent pas. Des lésions au niveau de leur patrimoine génétique peuvent avoir des conséquences importantes sur le métabolisme cellulaire voire à terme entrainer leur mort. La préservation de l'intégrité des acides nucléiques au sein des neurones est donc essentielle au bon fonctionnement cérébral

IV.1 / L'ADN, LE SUPPORT DE L'INFORMATION GÉNÉTIQUE

IV.1.1 / STRUCTURE

Dans un article d'une seule page, publié le 25 avril 1953, le biophysicien Francis Crick et le généticien James Watson décrivent la « structure à deux chaînes hélicoïdales enroulées chacune autour du même axe » de l'ADN, imaginant alors « un possible

mécanisme de copie du matériel génétique ». L'ADN est formé par deux chaînes complémentaires chacune constituées d'un squelette de phosphodiester en alternance avec un sucre, le ribose. Chaque sucre porte une base azotée pouvant s'appareiller avec une seconde base azotée, ce qui permet de donner sa forme de double hélice à la molécule d'ADN.

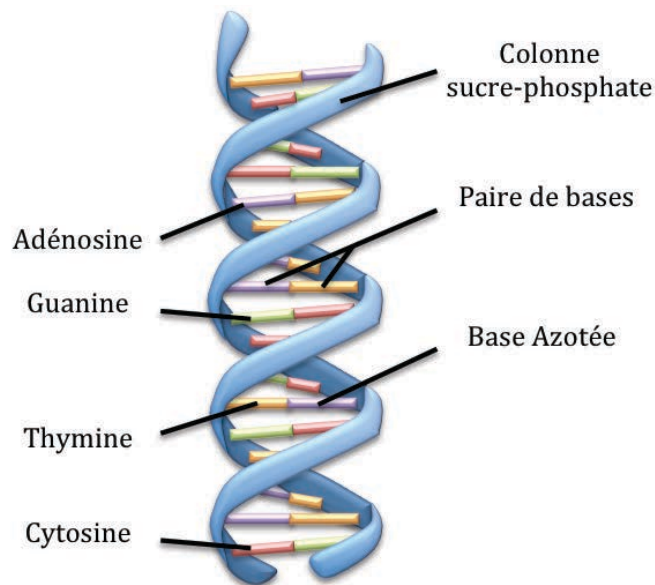


Figure 21 : Double hélice d'ADN. La molécule d'ADN est composée d'un squelette de phosphodiester en alternance avec un sucre, le ribose. Chaque sucre porte une base azotée. Il existe 4 bases azotées différentes au sein de l'ADN : l'adénosine s'apparie avec la thymine ; la guanine s'apparie avec la cytosine.

Il existe 4 bases azotées différentes constituant l'ADN : l'adénosine, la thymine, la guanine, et la cytosine. C'est l'enchaînement de ces quatre bases qui constituera l'information génétique propre à chaque individu. L'intégrité de la molécule d'ADN est essentielle à la propagation de la vie. Toutefois, les lésions au niveau de la séquence d'ADN ne sont pas rares puisque l'on considère qu'environ 1000 à 10000 dommages à l'ADN sont générés par cellule et par jour.

IV.1.2 / ORIGINES DES LÉSIONS

De nombreux agents environnementaux peuvent altérer l'intégrité de l'ADN. Parmi ceux-ci, on peut citer les rayonnements ultraviolets composant la lumière du soleil (UVA et UVB) et des radiations ionisantes (rayonnement cosmique, éléments radioactifs du sol, irradiations médicales). Des agents génotoxiques chimiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), polluants retrouvés dans la fumée de cigarette, sont aussi très impliqués dans la formation des lésions au niveau de l'ADN entraînant notamment des déficits dans la neurogénèse (La Maestra *et al.*, 2011). L'abus d'alcool engendre également des dommages au niveau de l'ADN des neurones qui peuvent à terme entraîner la mort neuronale (Kruman *et al.*, 2012).

Les lésions à l'ADN peuvent également trouver leur origine au niveau endogène. En effet, l'hydrolyse spontanée des bases survient dans tous les types de molécules biologiques. Dans l'espèce humaine il se produit dans chaque cellule et par jour environ 5000 dépurinations (hydrolyse entre le pentose et la base azotée) et environ 100 désaminations oxydatives (conversion de cytosine en uracile). La deuxième source endogène de lésions est les radicaux libres qui se forment au cours du métabolisme aérobie. L'une des modifications les plus fréquentes au niveau de l'ADN causés par les ROS générés est la 8 OHdG (hydroxylated nucleoside 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine). Les différents dommages causés peuvent entraîner des mutations au niveau de la séquence nucléotidiques de l'ADN. Cela peut également amener la cellule à produire des protéines non fonctionnelles. Une accumulation trop importante de dommages à l'ADN peut engendrer la mort de la cellule. (Hoeijmakers, 2001).

Récemment, il a été mis en évidence dans un modèle *in vivo* murin que l'exploration d'un nouvel environnement, tâche associée à une augmentation de l'activité neuronale et à l'encodage de nouvelle information, cause l'apparition de cassure double brin de l'ADN dans les régions associées à la mémoire. L'apparition de ces dommages à l'ADN est exacerbée par la présence du peptide amyloïde. Les auteurs suggèrent que le peptide amyloïde pourrait donc avoir un rôle délétère dans la stabilisation du génome ou interférer avec l'expression de gènes impliqués dans les fonctions cognitives (Suberbielle *et al.*, 2013).

IV.1.3 / LES PRINCIPALES VOIES DE RÉPARATION DE L'ADN

La capacité de réparation de l'ADN d'une cellule est essentielle à son bon fonctionnement puisqu'à terme l'accumulation de dommage peut entraîner la mort de la cellule. L'ensemble des mécanismes de réparation est complexe. En effet, chaque type de dommage va activer une voie de réparation particulière. Ainsi, chez l'Homme il existe principalement 5 systèmes de réparation (Figure n°22).

Dommages simple brin :

- **le BER** (Base Excision Repair), ou système de réparation par excision de base, qui répare les bases oxydées ou alkylées, les sites abasiques et les cassures simple brin.
- **le NER** (Nucleotide excision repair), ou système de réparation par excision de nucléotide, qui permet de réparer les déformations importantes de l'ADN tels que les pontages inter et intra-brins, les adduits volumineux et les dommages formés par les ultraviolets.
- **Le MMR** (MisMatch repair), ou système de réparation des mésappariements qui, comme son nom l'indique, prendra en charge de réparer les défauts d'assemblage des bases azotées

Cassure double brin :

- **Le NHEJ** (Non Homologue End-Joining), ou la jonction non homologue des extrémités
- **le HR** (Homologous Recombinaison) ou recombinaison homologue qui vont réparer les cassures doubles brins de l'ADN.

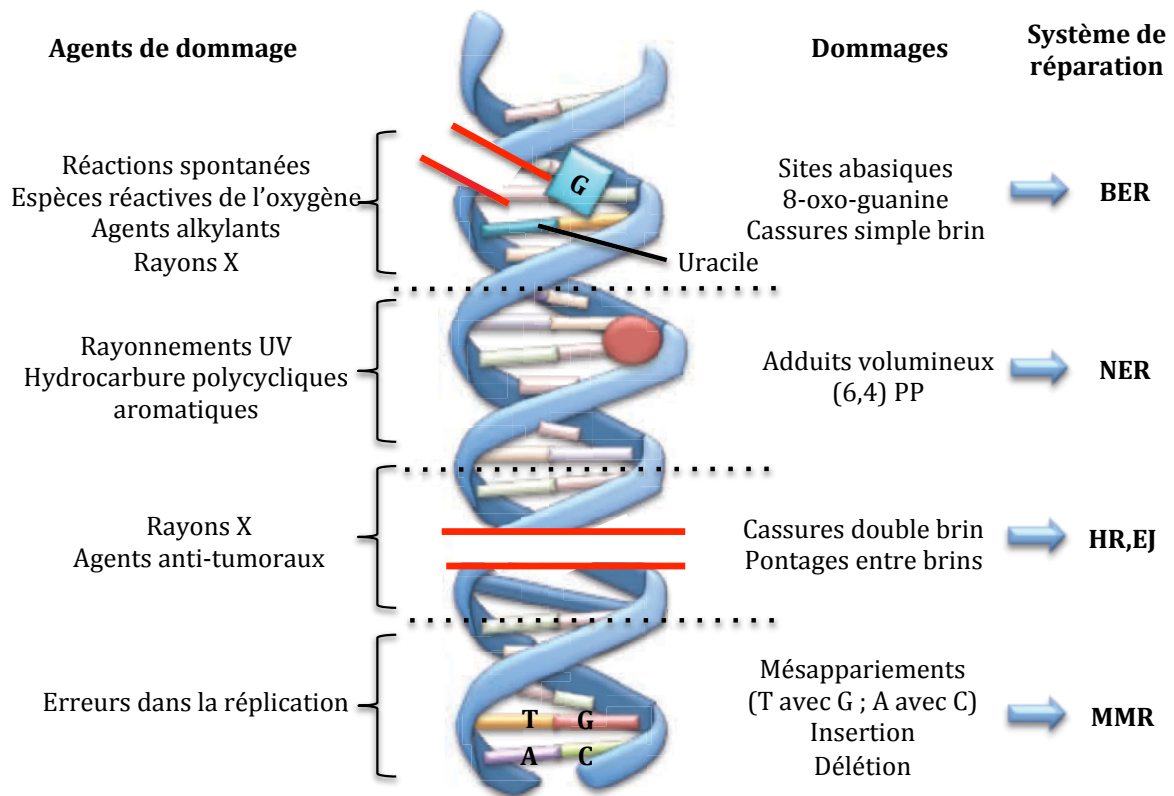


Figure 22 : dommages à l'ADN, causes et système de réparation. Principaux agents de dommages (à gauche), quelques dommages à l'ADN (milieu) et système de réparation prenant en charge les lésions (à droite).

IV.2 / LES ARN, EFFECTEURS DE L'EXPRESSION DE L'ADN EN PROTÉINE

IV.2.1 / GÉNÉRALITÉS ET STRUCTURE

Les ARN sont des polymères de nucléotides constitués dans la plupart des cas d'un seul brin. Les ARN sont composés de quatre bases azotées différentes, à l'identique de l'ADN à l'exception de l'uracile remplaçant la thymine.

Il existe différents types d'ARN présents dans les cellules des organismes vivants. Les principaux sont résumés dans le tableau suivant :

Type d'ARN	Fonctions
ARN ribosomiques (ARNr)	Constituent les ribosomes permettant la synthèse protéique
ARN de transfert (ARNt)	Elongation de la chaîne polypeptidique pendant la traduction
ARN messagers (ARNm)	Support de l'information transcrite à partir de l'ADN
ARN hétérogènes nucléaires (ARNhn)	Précurseurs des ARN messagers
Petits ARN stables	
ARN génomique	Virus / rétrovirus

Tableau 2 : Différents types d'ARN

Il semble qu'une grande partie du génome soit transcrite en ARN alors que seulement 1,2 % du génome soit traduit en protéines. L'importance quantitative et fonctionnelle des ARN non codants a longtemps été sous estimée. Parmi ces ARN non codants, les petits ARN non codants participent à différents mécanismes moléculaires tels que la traduction, l'épissage ou la transcription. Les ARN non codants dits « longs » sont quant à eux, moins connus.

IV.2.2 / ORIGINES DES LÉSIONS

Une des caractéristiques des maladies neurodégénératives est l'accumulation de protéines possédant des défauts de conformation (Dobson, 2003). Ces erreurs dans la conformation tridimensionnelle des protéines, peuvent résulter d'un défaut de synthèse et avoir des conséquences désastreuses pour les neurones, promouvoir l'agrégation de protéines (Ross and Poirier, 2004) et mener à terme à la mort neuronale (Lee *et al.*, 2006).

Les défauts de synthèse de protéines peuvent provenir de l'altération des ARN de la cellule. C'est pourquoi cette atteinte des ARN semble être un événement important dans les processus neurodégénératifs.

Les ARN sont particulièrement sensibles aux dommages. En effet, contrairement à la molécule d'ADN, les ARN ne disposent pas d'histones capables de les protéger des agents inducteurs de lésions. De plus, ils sont situés plus près des mitochondries sources de ROS. Plusieurs études ont montré que des ARN sont lésés dans les stades précoces des maladies neurodégénératives. C'est le cas notamment dans les cerveaux post-mortem de patients MCI (Ding *et al.*, 2005) et atteints de la maladie d'Alzheimer (Nunomura *et al.*, 1999).

Maintenir l'intégrité des ARN est crucial au bon fonctionnement cellulaire. Il y a encore quelques années, il était courant de penser que la réparation des ARN était inexistante du fait du grand nombre de copie d'un même ARN au sein de la cellule. La réparation de ces ARN semblait donc inutile et l'on pensait que les ARN endommagés étaient uniquement dégradés. Cependant, il est maintenant établi que cette réparation existe (Aas *et al.*, 2013).

IV.3 / LE STRESS OXYDANT, UN AGENT INDUCTEUR DE DOMMAGES AUX ACIDES NUCLÉIQUES NEURONAUX DANS LES TAUOPATHIES

II.3.1 / STRESS OXYDANT ET TAUOPATHIES

Les patients MCI pour « mild cognitive impairment » présentent des troubles cognitifs légers et possèdent un risque important de développer une démence. Ils sont souvent considérés comme un stade très précoce de la maladie d'Alzheimer. Chez ces patients, différentes modifications de l'ADN traduisant son oxydation sont retrouvées (Migliore *et al.*, 2005) (Wang *et al.*, 2006). L'apparition de dommages liés au stress oxydant est donc un phénomène qui apparaîtrait très tôt dans l'évolution de maladies neurodégénératives de type Alzheimer.

De même, les protéines de l'hippocampe et du cortex pariétal sont plus carbonylées chez les patients atteints de la MA que chez les patients sains (Hensley *et al.*, 1995).

Le stress oxydant est une caractéristique importante des maladies neurodégénératives (pour revue (Dasuri *et al.*, 2013). L'augmentation de la quantité d'espèces réactives de l'oxygène dans les neurones a des conséquences importantes sur l'intégrité des acides nucléiques.

II.3.2 / STRESS OXYDANT ET DOMMAGES À L'ADN

Les neurones devant survivre toute la vie de l'individu, les lésions non réparées au niveau de l'ADN s'accumuleront avec le temps (Lagouge and Larsson, 2013). L'oxydation des bases de l'ADN, dont la plus fréquente est la 8-OHdG, peut entraîner des mutations ou des cassures des brins.

Gabitta *et collaborateurs* ont comparé les lésions oxydatives de l'ADN nucléaire de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer avec des cerveaux de sujets sains du même âge (Gabbita *et al.*, 1998). Leur étude rapporte que l'ADN des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est plus endommagé que l'ADN des sujets sains au niveau des cortex frontaux, temporaux et pariétaux. Cette augmentation des lésions génomiques a également été observée dans le liquide céphalo-rachidien (Abe *et al.*, 2002).

II.3.2 / STRESS OXYDANT ET DOMMAGES AUX ARN

Les ARN sont une cible des espèces réactives de l'oxygène. La plus fréquente des lésions oxydatives sur les ARN est la 8-OHG (hydroxylated nucleoside 8-hydroxy-2'-oxyguanosine). Sa présence est fortement augmentée dans les cerveaux de patients atteints de la MA et dans les patients MCI (Nunomura *et al.*, 2012). L'ensemble des ARN peuvent être endommagés, que ce soit les ARN codants ou non codants. L'accumulation de dommages aux ARN peut entraîner la synthèse de protéines non fonctionnelles.

La MA est caractérisée, dans les phases précoces, par une augmentation du stress oxydant dans le cerveau des patients. L'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) dans les neurones mène notamment à l'apparition de dommages au niveau de leur ADN génomique et au niveau des ARN. Les neurones ne se divisant pas, l'accumulation de dommages non réparés au niveau de la molécule d'ADN a, à terme, des conséquences importantes sur leur fonctionnement. Les dommages au niveau des ARN sont également importants puisqu'ils peuvent entraîner entre autre la formation de protéines non fonctionnelles

OBJECTIFS

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La fonction la plus connue pour Tau en condition physiologique, est son rôle de MAP. Cependant, la protéine Tau possède également d'autres localisations et par conséquent pourrait avoir d'autres fonctions. Cette protéine peut se lier à la membrane plasmique (Brandt et al., 1995) et se localise également au niveau du noyau neuronal (Brady et al., 1995; Adamec et al., 2002; Álvarez et al., 2012). Ce sont ces deux localisations moins étudiées, qui vont nous intéresser dans cette thèse.

Objectif 1 : Le cerveau pour fonctionner a besoin d'une quantité très importante d'oxygène. Cet oxygène sera ensuite transformé en énergie par l'intermédiaire des mitochondries. Cela engendre la formation « d'espèces réactives de l'oxygène » (ou ROS). Notre organisme en produit donc en permanence. Cependant, si ces ROS sont produites de manière trop importantes ou si elles ne sont pas suffisamment éliminées, elles entraînent des dégâts cellulaires importants comme des dommages à l'ADN. L'ADN génomique des neurones est particulièrement sensible aux ROS. En effet, comme les neurones sont des cellules post-mitotiques, les dommages oxydatifs non réparés au niveau de leur ADN s'accumulent avec le temps. Or l'accumulation de dommages à l'ADN neuronal peut entraîner un dysfonctionnement des neurones et une neuro-dégénérescence (Borgesius et al., 2011).

Il a été montré dans le laboratoire que la protéine Tau nucléaire est capable de protéger l'ADN des dommages induits par un stress oxydant ou un stress hyperthermique, tous deux produisant des ROS. Cette étude a été menée dans des cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de souris (Sultan et al., 2011).

Le premier objectif de mes travaux de thèse a été de **savoir si la protéine Tau était également capable de protéger l'intégrité de l'ADN *in vivo* chez des souris adultes en condition physiologique et de stress hyperthermique.**

Pour cela nous avons tout d'abord mis en place un modèle murin de stress hyperthermique. Ce modèle *in vivo* permet la génération de ROS dans le cerveau de souris adulte. Nous avons étudié chez des souris sauvages ou déficientes en protéine Tau l'intégrité des acides nucléiques en condition physiologique et de stress hyperthermique.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication soumise dans le journal « Frontiers in Cellular Neurosciences ».

A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection *in vivo* under physiological and hyperthermic conditions.

Marie Violet, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Raphaëlle Caillierez, Smail Talahari, Fabrice Nessler, Bruno Lefebvre, Eliette Bonnefoy, Luc Buée, Marie-Christine Galas.

Objectif 2 :

La maladie d'Alzheimer est la démence la plus fréquente dans nos sociétés occidentales. Elle est, entre autre, caractérisée par la présence de dommages oxydatifs au niveau des acides nucléiques des neurones des patients. Ces dommages apparaissant très tôt dans l'évolution de la maladie, ont des conséquences importantes sur le fonctionnement neuronal. La MA est également caractérisée par deux lésions histopathologiques. Ces lésions sont les plaques séniles constituées majoritairement de peptide amyloïde et les DNF constituées majoritairement de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée.

De plus, il apparaît dans la littérature que bien plus que les formes agrégées de Tau, ce sont des formes oligomériques solubles qui sont toxiques pour les neurones. Elucider les mécanismes impliqués dans l'oligomérisation de Tau est donc essentiel pour comprendre l'apparition de la MA. Or, la protéine Tau ne s'oligomérisent pas spontanément. Elle a besoin d'un agent inducteur. Nous avons donc également étudié si la production de ROS dans notre modèle pouvait entraîner l'oligomérisation de Tau comme observé pour le peptide amyloïde dans la littérature (Murakami *et al*, 2011) et si

des oligomères de Tau pourraient induire une altération de l'intégrité des acides nucléiques.

Le deuxième objectif de mes travaux de thèse a été de **comprendre si la pathologie Tau entraîne la perte de sa fonction protectrice de l'ADN en condition de stress et participe de ce fait à l'étiologie de la MA.**

Afin d'étudier l'effet de la pathologie Tau, nous avons utilisé un modèle de souris transgéniques développé au sein du laboratoire, le modèle THY-Tau22. Ce modèle murin surexprime une isoforme 4R de Tau humaine (hTau) possédant deux mutations retrouvées dans certaines FTDP-17 (mutations G272V et P301S), sous contrôle du promoteur neuronal THY 1.2. Le modèle THY-Tau22 présente une accumulation progressive de protéines hTau au niveau de l'hippocampe puis, dans une moindre mesure au niveau cortical (Schindowski et al., 2006). Les souris THY-Tau22 présentent des altérations progressives de l'apprentissage et de la mémoire spatiale en parallèle du développement de la pathologie Tau. Les déficits d'apprentissage commencent dès l'âge de trois ou quatre mois. A l'âge de douze mois, les souris présentent d'importants déficits de mémoire (Schindowski et al., 2006). Des souris THY-Tau22 à différents stades de la pathologie (faible, modéré, sévère) ont été soumises à un stress hyperthermique. Nous avons étudié l'effet d'un stress hyperthermique sur l'intégrité de l'ADN ainsi que sur la pathologie Tau.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication en préparation :

Hyperthermia promotes Tau oligomerization and nuclear nucleic acid damage in an AD-like transgenic mouse model.

Marie Violet, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Elodie Marciniak, Vincent Deramecourt, Sandrine Humez, Rakez Kayed, Lester Binder, Bruno Lefebvre, Eliette Bonnefoy, Luc Buée, Marie-Christine Galas.

Objectif 3 : Nous nous sommes également intéressés à la localisation membranaire de Tau. Jusqu'à présent, l'état de phosphorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques n'avait été que très partiellement décrit dans le cerveau. C'est pourquoi notre troisième objectif était de caractériser les formes de Tau présentes au niveau des radeaux lipidiques en condition physiologique et pathologique.

Pour ce faire, nous avons isolé des radeaux lipidiques à partir de cortex de souris et de cerveaux de patients sains ou atteints de la MA.

RÉSULTATS

I/ RÔLE PROTECTEUR DE TAU VIS-À-VIS DE L'ADN ET D'ARN *IN VIVO* EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE ET DE STRESS HYPERTHERMIQUE

I.1/ OBJECTIFS

Longtemps décrite uniquement comme étant une protéine cytosolique, Tau peut également se localiser au sein du noyau des neurones (Brady et al., 1995; Sultan et al., 2011; Monroy-Ramírez et al., 2013). Des données indiquent que Tau est capable de protéger l'ADN génomique de dommages induits par les radicaux libres (Sultan *et al.*, 2011) Cela a été montré dans le laboratoire, dans un modèle de cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de souris. En effet, sous l'effet d'un stress hyperthermique, utilisé afin de mimer un stress oxydant (Bruskov et al., 2002), la protéine Tau va transloquer et s'accumuler dans le noyau et protéger l'ADN des dommages induits par le stress.

Mais qu'en est-il *in vivo* ? La protéine Tau est-elle toujours capable de protéger l'ADN neuronal ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons tout d'abord mis au point un modèle murin de stress hyperthermique. Ce modèle permet d'étudier l'impact de l'augmentation du stress oxydant, une caractéristique très précoce observée dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Nous avons vérifié le caractère protecteur de Tau vis-à-vis de l'ADN en condition physiologique et de stress hyperthermique.

I.2/ RÉSULTATS

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

A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection *in vivo* under physiological and hyperthermic conditions

Running title: Tau protects DNA and RNA

Authors: Marie Violet^{1¶}, Lucie Delattre^{1¶}, Meryem Tardivel¹, Audrey Sultan¹, Alban Chauderlier¹, Raphaëlle Caillierez¹, Smail Talahari², Fabrice Nessler², Bruno Lefebvre¹, Eliette Bonnefoy³, Luc Buée¹, Marie-Christine Galas^{1*}

1. Inserm UMR837, Alzheimer & Tauopathies, 1 rue Michel Polonovski, 59045 Lille, France, Université Droit et Santé de Lille, Jean Pierre Aubert Research Centre, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Faculté de Médecine-Pôle Recherche, Lille, France, CHU-Lille, Lille, France,

2. Laboratoire de toxicologie génétique, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du professeur Calmette, France

3. CNRS FRE 3235, Génétique Moléculaire et Défense Antivirale, 45 rue des Saints Pères, Paris, France.

Correspondence :

Marie-Christine Galas Inserm UMR837, Alzheimer and Tauopathies, 1 rue Michel Polonovski, 59045 Lille. France. marie-christine.galas@inserm.fr

Total number of words (including introduction, material and methods, results and discussion) : 4035

Figures : 6

Abstract

Nucleic acid protection is a substantial challenge for neurons, which are continuously exposed to oxidative stress in the brain. Neurons require powerful mechanisms to protect DNA and RNA integrity and ensure their functionality and longevity. Beside its well known role in microtubule dynamics, we recently discovered that Tau is also a key nuclear player in the protection of neuronal genomic DNA integrity under reactive oxygen species (ROS)-inducing heat stress (HS) conditions in primary neuronal cultures. In this report, we analyzed the capacity of Tau to protect neuronal DNA integrity *in vivo* in adult mice under physiological and HS conditions. We designed an *in vivo* mouse model of hyperthermia/HS to induce a transient increase in ROS production in the brain. Comet and TUNEL assays demonstrated that Tau protected genomic DNA in adult cortical and hippocampal neurons *in vivo* under physiological conditions in wild-type and Tau-deficient (KO-Tau) mice. HS increased DNA breaks in KO-Tau neurons. Notably, KO-Tau hippocampal neurons in the CA1 subfield restored DNA integrity after HS more weakly than the dentate gyrus neurons. The formation of phosphorylated histone H2AX foci, a double-strand break marker, was observed in KO-Tau neurons only after HS, indicating that Tau deletion did not trigger similar DNA damage under physiological or HS conditions. Moreover, genomic DNA and cytoplasmic and nuclear RNA integrity were altered under HS in hippocampal neurons exhibiting Tau deficiency, which suggests that Tau also modulates RNA metabolism. Our results suggest that Tau alterations lead to a loss of its nucleic acid safeguarding functions and participate in the accumulation of DNA and RNA oxidative damage observed in the Alzheimer's disease brain.

Key words: Tau, oxidative stress, hyperthermia, DNA damage, RNA damage, γ -H2AX, DNA repair

1. Introduction

Altered DNA and RNA integrity is particularly harmful in differentiated neurons. Non-repaired nucleic acids trigger transcriptional and translational deregulation, which leads to reduced protein synthesis, protein mutation, the production of truncated proteins and genomic instability. Oxidative stress generates a wide range of nucleic acid lesions including base modifications, deletions and strand breaks. Neurons in the brain continuously face the harmful effects of oxidative stress due to high oxygen consumption. Therefore, the preservation of nucleic acid integrity from oxidative damage is essential to maintain neuronal functionality and ensure their longevity (Englander *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2007; Englander *et al.*, 2008; Mantha *et al.*, 2013). To decipher the defense mechanisms involved in the protection of neuronal DNA integrity in normal brain is crucial to understand DNA alteration observed in neurodegenerative diseases (Brasnjevic *et al.*, 2008 ; Coppédé and Migliore, 2009).

Tau plays a well-known role in microtubule assembly and stabilization. It has recently been shown that Tau functions as an essential nuclear player in the protection of neuronal genomic DNA integrity under reactive oxygen species (ROS)-producing heat stress (HS) in primary neuronal cultures (Sultan *et al.*, 2011). We observed that oxidative stress and HS in wild-type (WT) neurons led to Tau nuclear accumulation, which protected DNA integrity from HS-induced damage (Sultan *et al.*, 2011). However, the mechanisms responsible for Tau-mediated DNA protection are unknown. DNA protection may be mediated partially through Tau interactions with the A-T-rich DNA minor groove (Sjoberg *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2011; Camero *et al.*, 2013) ; however, a role for Tau in DNA repair mechanisms cannot be excluded.

As this new and major DNA protective role of nuclear Tau has been described in primary neuronal cultures (Sultan *et al.* 2011). The major aim of this work was to analyze the capacity of Tau to protect neuronal DNA integrity *in vivo* in adult mice under physiological and HS conditions to overcome any potential artefactual effects related to the embryonic origin of cultured neurons.

Using a novel *in vivo* mouse model of transient hyperthermia/HS, this study demonstrated the efficiency of the DNA protective function of Tau in neurons *in vivo*. We showed that Tau was indispensable for the protection of neuronal DNA integrity in the cortex and hippocampus of adult mice under physiological and HS conditions. Tau deletion did not trigger similar DNA damage under physiological and HS conditions. Tau was involved in the DNA double-strand break repair process specifically under HS. Notably, hippocampal neurons in the CA1 subfield showed a reduced ability to restore DNA integrity after HS than neurons in the dentate gyrus (DG). Surprisingly, our data obtained indicated that Tau deficiency altered the integrity of genomic DNA and cytoplasmic and nuclear RNA., suggesting that Tau could protect both RNA and DNA.

2. Material and methods

2.1. Animals

Seven month-old homozygous female KO Tau mice (Tucker *et al.*, 2001) and littermate WT mice were used to assess the role of Tau in DNA protection in aged mice. All animals were maintained in standard animal cages under conventional laboratory conditions (12 h/12 h light/dark cycle, 22°C), with *ad libitum* access to food and water. The animals were maintained in compliance with institutional protocols and all animal experiments were performed in compliance with, and following the approval of the local Animal Resources Committee (CEEA 342012 on December 12, 2012), standards for the care and use of laboratory animals, and the French and European Community guidelines. Three different mice have been used in each group for all experiments.

2.2. *In vivo* hyperthermia model

We designed an *in vivo* mouse model of transient hyperthermic stress based on the rat model described previously by Papanicolaou (1996). The mice were anesthetized using xylazine (20 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) and maintained in a 37°C environment for 30 minutes to avoid anesthesia related hypothermia and Tau hyperphosphorylation as previously described (Planel *et al.* 2007). The mice were then maintained at 37°C (control (C) group) or heat stressed (HS group) by being placed in an incubator containing ambient air heated to 44°C for 20 minutes. The rectal temperature of the mice was monitored every 10 minutes and did not exceed 41°C. In the (HS+24H) group, mice were subjected to HS during 20 minutes and then returned to room temperature during 24H.

2.3. Oxidative stress-induced protein damage

Protein oxidation was analyzed using an OxyIHC oxidative stress-detection kit (Millipore) according to the manufacturer's directions. Protein carbonyl groups generated by oxidative stress were visualized using immunolabeling after reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH).

2.4. Tissue collection for immunoblotting and confocal microscopy

The mice were euthanized through cervical dislocation, and their brains were rapidly removed. One hemisphere of each brain was post-fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. The hippocampus and cortex were dissected from the other hemisphere and used for biochemical analyses.

2.5. Mouse brain cytoplasmic and nuclear fractionation

Mouse tissues were harvested in ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl,

0.15% NP-40) supplemented with protease inhibitors (Complete Mini-Roche) and phosphatase inhibitors (125 nM okadaic acid and 1 mM orthovanadate). The tissues were mechanically homogenized using a 50-ml all-glass homogenizer on ice and centrifuged at 100 g for one minute. The supernatant was collected, and a second homogenization was conducted. The supernatant was collected as the cytoplasmic fraction after centrifugation at 1000 g for ten minutes. The pelleted nuclei were washed three times and lysed in ice-cold RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete Mini-Roche) and phosphatase inhibitors (125 nM okadaic acid and 1 mM orthovanadate). The samples were sonicated and centrifuged at 12000 g at 4°C for 20 minutes to yield the supernatant as the nuclear fraction. The protein concentrations were determined using a BCA assay kit. Lamin B and synaptophysin (SYP) were used as specific nuclear and cytoplasmic markers, respectively.

2.6. Electrophoresis and immunoblotting

Electrophoresis and immunoblotting were performed as described previously (Sultan *et al.*, 2011) using a Tau C-terminal antibody as described previously (Galas *et al.* 2006). The results are expressed as the mean±S.E.M. of three different mice. ImageJ software was used for quantification.

2.7. *In vivo* comet assay

The alkaline *in vivo* comet assay was specifically developed in the cortex for this project. The mouse cortices were dissected and mechanical disaggregation of each tissue was performed by using the Medimachine® system (Becton Dickinson). A small piece of cortex was inserted into a Medicon (i.e., a disposable chamber containing an immobile stainless steel screen allowing for efficient cutting) with approximately 1.0 mL of PBS buffer. The Medicon was thus inserted into the Medimachine® which was then run for 5 sec. Once the tissue was processed, the cell suspension was recovered and viability was assessed using the trypan blue exclusion method. Cell viability was assessed using the trypan blue exclusion method. The comet assay was performed as described previously (Sultan *et al.*, 2011). The Olive tail moment (OTM) (Olive *et al.*, 1990) was used to evaluate DNA damage. The OTM, expressed in arbitrary units, is calculated by multiplying the percent of DNA fluorescence in the tail by the length of the tail in micrometers. The tail length is measured between the edge of comet head and the end of the comet tail. A major advantage of using the OTM as an index of DNA damage is that both the amount of damaged DNA and the distance of migration of the genetic material in the tail are represented by a single number.

2.8. TUNEL staining

Terminal deoxyribonucleotidyltransferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) staining was conducted on tissue slices using the TUNEL Apoptosis Detection Kit (Millipore) according to the manufacturer's instructions. Tissue slices were pre-treated with low concentration of

DNase (1 µg/mL during 1H) to perform positive controls. The TUNEL assay is often used to detect late apoptosis-induced DNA breaks; however, it also detects accessible 3'-hydroxyl (3'-OH) groups that are generated from DNA single- or double-strand breaks under non-apoptotic conditions (Liu *et al.*, 2005).

2.9. DNase and RNase treatments

Brain slices from heat-stressed KOTau mice were incubated with DNase-free RNase (0.5 mg/mL, 3 h, Roche), RNase-free DNase (0.2 mg/mL, 3 h, Millipore #17-141h) or a mixture of DNase/RNase prior to the TUNEL assay.

2.10. Immunofluorescence

Sagittal (5 µM) brain slices were deparaffinized and unmasked using citrate buffer (3.75 mM acid citrate, 2.5 mM disodium phosphate, pH 6) for 10 minutes in a domestic microwave. The slices were submerged for 1 h in 1% horse serum (Vector Laboratories), and the primary antibodies were incubated overnight at 4°C in the presence of PBS-0.2% Triton using the following primary antibodies: total Tau (Tau CTer) and Tau1 antibodies (Galas *et al.*, 2006) and the phospho-histone H2A.X (Ser 139) antibody from Millipore.

These antibodies were revealed via secondary antibodies coupled to Alexa 488 or 568 (Life Technologies). The sections were counterstained and mounted with Vectashield/DAPI (Vector Laboratories). DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) was used as a chromatin counterstain.

2.11. Imaging systems and immunofluorescence quantification

Mouse hippocampal sections were acquired using an LSM 710 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss). The confocal microscope was equipped with a 488-nm Argon laser, 561-nm diode-pumped solid-state laser and a 405-nm ultraviolet laser. The images were acquired using an oil 40x Plan-NEOFLUAR objective (1.3 NA) and an oil 63X Plan-APOCHROMAT objective (1.4 NA). All recordings were performed using the appropriate sampling frequency (eight bits, 1024-1024 images and a line average of four). Serial sections from the three-dimensional reconstruction were acquired using Z-steps of 0.2 µm.

Images is an array of pixel and each pixel contains information about the different light intensity or color. This information is encoded in grid as a gray level. The gray values or gray scale describe the fluorescence intensity of every pixel. Acquisitions in confocal microscope are executed in 8 bits, therefore the different values of gray level of a pixel that can take are from 0 to 255 levels (0 no signal and 255 maximum signal).

The elliptical selection tool of ImageJ marked 20 to 30 representative nuclei based on DAPI staining (Fig. 1). All immunofluorescence quantifications from the nuclear mean intensity fluorescence are expressed in gray values, and image analyses of the raw data were obtained using ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/gate2.inist.fr/ij/>, NIH, USA) and ZEN (Carl Zeiss) software programs. The results

are expressed as the mean±S.D. of the gray value from 20 to 30 different nuclei or at least three different areas of the CA1 cell layer.

2.12. Statistics

Student's *t*-test (BiostaTGV software, Jussieu, France) was used to determine the significance (*p* value) between groups for immunoblotting and immunofluorescence analysis. A *p*-value <0.05 was considered to indicate a significant difference.

3. Results

3.1. Tau protects neuronal DNA integrity in an *in vivo* mouse model under physiological and hyperthermic conditions

We have shown previously that nuclear Tau protects DNA integrity in primary neuronal cultures of embryonic origin (Sultan *et al.* 2011). We designed an *in vivo* mouse model of transient hyperthermia/heat stress (HS) that induced ROS production in the cortex and the hippocampus, a region in the mouse brain particularly sensitive to oxidative stress, to investigate the physiological relevance of the DNA-protective function of Tau.

The ability of HS to induce oxidative stress (Flanagan *et al.*, 1998) in the cells of 7-month (7m) WT and KO-Tau mice was qualitatively analyzed through the immunohistochemical detection of carbonyl groups added to proteins (Fig. 2). HS induced an increase of the carbonyl immunolabelling both in WT and KO-Tau cells in sagittal hippocampal sections.

The data obtained after Western blot analysis indicated that Tau was present in the nuclei of neurons from the cortex and hippocampus of WT mice under physiological conditions (Figs. 3A, B), which is consistent with previous results in neuronal cultures (Sultan *et al.*, 2011). HS increased Tau nuclear localization, also as observed previously in neuronal cultures (Sultan *et al.* 2011). The HS-induced nuclear accumulation of Tau in both regions was reversible. Tau in cortical and hippocampal nuclear extracts from WT mice was positively labelled with Tau1 antibody in physiological and HS conditions showing that nuclear Tau was predominantly dephosphorylated at epitope Ser195-202 (Figs. 3A, B), as previously described in cultured neurons (Sultan *et al.*, 2011).

The degree of DNA damage was monitored using a single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in the cortices of 7m WT and KO-Tau mice under control and HS conditions to analyze the capacity of Tau to protect neuronal DNA integrity *in vivo*. A highly significant enhancement of the median Olive Tail Moment (OTM), which reflects DNA fragmentation, was observed in KO-Tau mice compared with WT mice under physiological conditions (2.5-fold in KO-Tau C vs. WT C, *p*<0.001), which shows that the Tau protein plays

a major role in the protection of DNA integrity *in vivo* in the adult mouse brain (Fig. 4A). HS treatment also selectively increased the OTM in KO-Tau mouse cells (1.4-fold in KO-Tau HS vs. KO-Tau C, $p < 0.05$); however, no significant induction of DNA damage was observed after HS treatment in WT mice (Fig. 4A).

The TUNEL assay was performed to specifically visualize and quantify DNA breaks *in vivo*. Sagittal hippocampal sections from non-treated or HS-treated WT and KO-Tau mice were subjected to TUNEL assays, and the results were imaged using laser-scanning confocal microscopy (Fig. 4B). Nuclear TUNEL fluorescence was specifically quantified in the neurons (Fig. 4C) of two distinct hippocampal areas, the DG and the CA1 subfield. A strong and highly significant difference was observed between WT and KO-Tau mice under control and HS conditions, consistent with the Comet assays. TUNEL nuclear intensity was dramatically higher in the DG and CA1 of KO-Tau mice compared with WT mice under control condition (≈ 20 -fold increase in DG and CA1 KO-Tau C vs. WT C, $p < 0.001$). Altogether, these observations support an essential physiological role for Tau in the protection of neuronal DNA integrity. HS significantly increased TUNEL-positive cells in KO-Tau mice compared with control (C) non-treated cells (CA1, 1.6-fold in KO-Tau HS vs. KO-Tau C DG, $p < 0.001$; DG, 2.5-fold in KO-Tau HS vs. KO-Tau C, $p < 0.001$). Only a fraction of the hippocampal neurons were TUNEL-positive after HS, which reflects the heterogeneity of the stress response between neurons (Fig. 4B). As a positive control, DG and CA1 sagittal sections from seven-month-old WT mice in control condition were pretreated with a low concentration of DNase to create substrate for the end-labeling reaction (Fig. 4B). The level of gray was quantified within the nuclei in cells from DG and CA1 subfields in the positive control and compared to the averaged grey levels in the DG and CA1 regions in HS condition (DG : 70% in KOTau HS vs. positive control ; CA1 : 100% in KOTau HS vs. positive control), showing the potent effect of HS to induce nucleic acid breaks in KOTau neurons.

KO-Tau mice were allowed to recover for 24 h at room temperature after HS to investigate the later effects of HS-induced DNA damage. The nuclear TUNEL fluorescence in DG neurons returned to basal levels ($p < 0.001$); however, the nuclear TUNEL fluorescence only partially decreased in CA1 cells (1.2-fold in KO-Tau HS+24H compared with KO-Tau HS, $p < 0,05$; Fig. 4C). These results demonstrate the persistence of DNA damage selectively in CA1 neurons.

No change in cell density was detected (Fig. 4D), which demonstrates the absence of HS-induced cell toxicity in KOTau mice in our *in vivo* HS model.

3.2. H2AX phosphorylation is induced in KO-Tau neurons only after hyperthermia

The production of DNA double-strand breaks (DSB) leads to H2AX phosphorylation (γ -H2AX) under normal conditions (Kuo and Yang; 2008), which is necessary to initiate DSB repair. We performed fluorescent immunohistochemical labeling using an anti- γ -H2AX antibody in hippocampal sections from WT and KO-Tau mice before and after HS treatment to investigate DSB formation (Fig. 5A). No significant increase in γ -H2AX labeling was observed between 7m WT and KO-Tau mice under control conditions. However, a strong increase in nuclear γ -H2AX foci was observed in KO-Tau hippocampal (DG and CA1) cells after HS treatment (Fig. 5A).

A strong increase in γ H2AX levels (3.2 fold in HS KO-Tau vs. HS WT, $p < 0.05$) was also specifically observed in lysates from KO-Tau hippocampi after HS treatment (Fig. 5B) using immunoblotting. These results indicate that only HS-induced neuronal DNA damage in KO-Tau mice led to γ -H2AX foci production γ H2AX fluorescent labeling and TUNEL assays were performed concomitantly in hippocampal slices of 7m KO-Tau mice (Fig. 5C). HS specifically evoked γ H2AX foci formation on chromatin in certain TUNEL-positive neurons, as observed in the TUNEL/ γ -H2AX, γ -H2AX-DAPI and TUNEL-DAPI overlays.

γ -H2AX labeling in DG cells from KO-Tau mice decreased to basal levels 24 h after HS (Fig. 5D), which is similar to the TUNEL staining. This result further confirms the capacity of the DG cells in KO-Tau mice to repair HS-induced DNA damage. In contrast, discrete γ -H2AX foci persisted in the nuclei of CA1 neurons, which indicated the reduced capacity of CA1 neurons to fully restore DNA integrity after HS.

3.3. Hyperthermia alters DNA and RNA integrity in KO-Tau neurons

The TUNEL-positive staining described in Fig. 3B was also present in the cytoplasm of KO-Tau neurons (Fig. 6). Cytoplasmic TUNEL staining was diffuse and, therefore, did not correspond to mitochondrial DNA fragmentation. We hypothesized that the cytoplasmic TUNEL labeling reflected RNA fragmentation because the TUNEL assay is based on fluorochrome labeling of 3'-OH termini after nucleic acid breaks.

Hippocampal sagittal sections from heat-stressed 7m KO-Tau mice were incubated with high concentrations of DNase-free RNase, RNase-free DNase or a mixture of DNase and RNase to investigate the possibility that the cytoplasmic TUNEL staining corresponded to RNA strand breaks (Fig. 6).

Pre-treatment with RNase fully abolished cytoplasmic TUNEL staining and partially abolished nuclear TUNEL staining, which suggested that the cytoplasmic staining and a portion of the nuclear staining was HS-induced RNA damage in KO-Tau neurons. Pre-treatment with DNase only partially removed nuclear TUNEL staining despite the complete disappearance of DAPI staining, which indicates complete DNA degradation. This result suggests that nuclear RNA is damaged after HS in KO-Tau neurons. Concomitant pre-treatment with DNase and RNase fully abolished cytoplasmic and nuclear TUNEL staining, which confirms the specific alterations of these nucleic acids in stressed KO-Tau neurons. These results suggest that DNA and nuclear and cytoplasmic RNA are damaged after HS in KO-Tau neurons.

4. Discussion

4.1. DNA protective function of Tau *in vivo*

The present study demonstrates a novel, major physiological role for nuclear Tau in the protection of neuronal DNA integrity *in vivo* in the adult mouse brain under physiological conditions ; the absence of Tau rendered neuronal cells abnormally susceptible to HS-induced DNA damage.

Neurons in the brain encounter recurrent oxidative stress throughout their lifespan. The high basal levels of DNA damage in KO-Tau compared with WT neurons in aged mice under physiological conditions likely reflected a loss of the intrinsic protective function of Tau against chronic endogenous oxidative stress in the brain. It may contribute to the different deficits observed with age in Tau KO mice (Ke *et al.*, 2012).

We designed a novel *in vivo* mouse model of transient hyperthermia/HS as a valuable and useful tool to easily investigate the effects of a transient and acute ROS increase in the whole brain of WT or transgenic mice. This model can be used to delineate the role of Tau in DNA protection under oxidative stress conditions. However, we cannot exclude the possibility that effects other than oxidative stress are involved in hyperthermia (Morano *et al.*, 2012). This model demonstrated that hyperthermia potentiated DNA alterations in the absence of Tau *in vivo*, which reproduces the DNA protective role of Tau under HS conditions in primary neuronal cultures (Sultan *et al.*, 2011).

Altogether these results show that Tau plays an essential role to preserve DNA integrity in adult neurons *in vivo* under physiological and HS conditions.

4.2. Tau modulates DNA double-strand break repair

DNA damage in neurons triggers a cascade of highly potent DNA repair mechanisms to maintain genome integrity (Canugovi *et al.*, 2013). DNA damage responses can induce highly dynamic post-translational modifications of histones that are critical for the DNA repair process (Lukas *et al.*, 2011). Double-strand breaks, one of the most toxic forms of DNA damage, quickly induce phosphorylation at serine 139 in the C-terminal sequence of histone H2AX (γ -H2AX), which promotes the recruitment of multiple DNA repair factors.

The absence of strong γ -H2AX accumulation in KO-Tau neurons under control conditions notwithstanding the strong increase in neuronal DNA damage in KO-Tau compared with WT mice observed using Comet and TUNEL assays, indicated that the DNA damage accumulation in Tau-deficient mice under physiological conditions differs from the HS-induced damage. This result suggests that chronic oxidative stress primarily induces single breaks rather than double-strand breaks or that the double-strand break repair process is impaired in KO-Tau neurons under physiological conditions.

Conversely, hyperthermia induced a strong and transient increase in γ -H2AX foci selectively in the nuclei of KO-Tau neurons, indicating that Tau deficiency induced the accumulation of non-repaired DNA double-strand breaks through altered DNA damage-induced chromatin post-translational modifications. This result suggests that Tau modulates double-strand break DNA repair responses under hyperthermia.

Hyperthermia-induced nucleic acid damage is reversible, which suggests that a Tau deficiency delays, but is not critical for, the DNA repair process. Tau likely plays a modulating rather than an essential role in double-strand break DNA repair mechanisms, and other proteins could compensate for its loss of function.

These results show an essential role for Tau in the control of DNA breaks under physiological conditions in adult neurons *in vivo* and a modulating role in the DNA double-strand break repair process under hyperthermia. Overall, this study suggests an important role of Tau in DNA repair mechanisms although we cannot exclude that Tau may only be involved in DNA protection.

4.3. Differential DNA vulnerability among hippocampal neurons

DNA from hippocampal neurons in the CA1 subfield showed a higher susceptibility to damage than DG neurons 24 h after hyperthermia. This result highlights the relative weakness of KO-Tau CA1 neurons to restore DNA integrity compared with DG neurons.

Selective deficiency in oxidized DNA repair has been reported in CA1 neurons compared to others hippocampal neurons under oxidative stress conditions, hypoxia, ischemia and neurodegeneration in Alzheimer's disease (AD) (Wang *et al.*, 2010).

Our data suggest that impaired Tau-dependent DNA repair plays a role in the selective vulnerability of CA1 neurons.

4.4. Relationship between Tau and RNA metabolism

The present *in vivo* study suggests that Tau deficiency triggers alterations in RNA integrity in hippocampal neurons under HS.

Indeed, RNA oxidation predominantly leads to strand breaks (Poulsen *et al.*, 2012). Cytoplasmic TUNEL staining has been described, but RNA fragmentation is rarely suggested as a possible cause. Nevertheless, TUNEL protocols often advise the use of RNase treatment to clear the so-called cytoplasmic background (Zhang *et al.* 2006).

However, as RNA integrity has been analyzed in an indirect way, further experiments like mass spectrometry would be necessary to confirm the alteration of RNA in KOTau mice.

It is generally acknowledged that altered RNA is degraded rather than repaired because very few RNA repair mechanisms have been described in mammalian cells (Aas *et al.*, 2003; Nunomura *et al.*, 2009). Cleaved RNA is particularly harmful for neurons because it can lead to the translation of dysfunctional truncated or mutated proteins. RNA damage accumulation in KO-Tau neurons suggests that Tau plays a role in the RNA quality control process in addition to its previously described genomic DNA protective function. Tau is an RNA-binding protein (Kampers *et al.*, 1996), and Tau may protect RNA partially through direct or indirect interactions. Further experiments are necessary to elucidate the potential role of Tau in RNA metabolism.

4.5. Conclusions

Our data suggest that Tau protection of DNA and RNA integrity plays a key role in nucleic acid integrity under physiological conditions and under ROS-producing stress such as hyperthermia.

Tau is impaired in several devastating neurodegenerative diseases (i.e., tauopathies) such as AD. An increase in oxidative DNA (Brasnjevic *et al.*, 2008 ; Coppedé and Migliore, 2009; Bradley-Whitman *et al.*, 2013) and RNA (Lovell *et al.*, 2011; Nunomura *et al.*, 2012) damage occurs in a subset of vulnerable neurons that exhibit Tau pathology during the early stages of AD. Therefore, the pathological forms of Tau may have altered nucleic acid protective functions. A loss of Tau-mediated nucleic acid functions may participate in the DNA and RNA damage accumulation observed in tauopathies.

Conflict of Interest Statement: No potential conflicts of interest relevant to this article are reported.

Authors Contributions

Marie Violet, Lucie Delattre, Alban Chauderlier, Audrey Sultan and Raphaëlle Caillierez performed the *in vivo* HS model, immunohistochemistry, TUNEL assay, Western Blot and cell viability. Meryem Tardivel performed the confocal microscopy analysis and quantification. Smail Talahari performed the Comet assay. Fabrice Nesslany designed and supervised the Comet assay. Luc Buée and Marie-Christine Galas designed and supervised the experiments. Eliette Bonnefoy, Bruno Lefebvre, Luc Buée and Marie-Christine Galas interpreted the data. Marie-Christine Galas wrote the manuscript. Eliette Bonnefoy, Bruno Lefebvre and Luc Buée revised the manuscript critically for important intellectual content. All authors approved the final version of the manuscript and are accountable for all aspects of the work.

5. Acknowledgments

This study was principally supported by the a grant from French government funding agency Agence Nationale de la Recherche MALZ EPITAUDNA and in part the FUI MEDIALZ, the LabEx (Laboratory of Excellence), DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease), Lille Métropole Communauté Urbaine (LMCU), Région Nord/Pas-de-Calais, FEDER and INSERM.

Many thanks are given to Dr. M.L. Caillet-Boudin for supportive discussions and Pr. J. Winderickx for insightful suggestions. We are grateful to the IMPRT (Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Lille) for access to the confocal microscopy platform and animal facility platform. We thank M. Besegher, I. Brion, D. Cappe, J. Devassine, Y. Lepage and D. Taillieu for animal care and D. Blum for animal management. We thank M.H. Gevaert and R.M. Siminski (Laboratoire d'histologie, Faculté de Médecine, Lille), M. Sendid, N. Zommer, C. Bournonville and S. Carrier for technical assistance.

6. References

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vågbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjørns, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., and Krokan, H.E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 20; 421:859-63.
- Borgesius, N.Z., de Waard, M.C., van der Pluijm, I., Omrani, A., Zondag, G.C., van der Horst, G.T., Melton, D.W., Hoeijmakers, J.H., Jaarsma, D., and Elgersma, Y. (2011). Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair. *J. Neurosci.* 31:12543-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1589-11.2011.
- Bradey-Whitman, M.A., Timmons, M.D., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Lynn, B.C., and Lovell, M.A. (2013). Nucleic Acid Oxidation: An early feature of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* [Epub ahead of print] doi: 10.1111/jnc.12444.
- Brasnjevic, I., Hof, P.R., Steinbusch, H.W., and Schmitz, C. (2008). Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *DNA repair (Amst)*. 7:1087-97. doi: 10.1016 /j.dnarep.2008.03.010.
- Camero, S., Benítez, M.J., Barrantes, A., Ayuso, J.M., Cuadros, R., Avila, J., and Jiménez, J.S. (2013). Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features which are Similar to those Found in Histone-DNA Complex. *J. Alzheimers Dis.* Nov 19. [Epub ahead of print].
- Canugovi, C., Misiak, M., Ferrarelli, L.K., Croteau, D.L., and Bohr, V.A. (2013). The role of DNA repair in brain related disease pathology. *DNA Repair (Amst)*. 12:578-87. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.04.010.
- Chen, L., Lee, H.M., Greeley Jr., G.H., and Englander, E.W. (2007). Accumulation of oxidatively generated DNA damage in the brain: A mechanism of neurotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 42(3) 385–393.
- Coppede, F., and Migliore, L. (2009). DNA damage and repair in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 6, 36-47.
- Englander, E.W. (2008). Brain capacity for repair of oxidatively damaged DNA and preservation of neuronal function. *Mech. Ageing Dev.* 129(7-8): 475-82.
- Englander, E.W., and Ma, H. (2006). Differential modulation of base excision repair activities during brain ontogeny: implications for repair of transcribed DNA. *Mech Ageing Dev.* 127(1):64-9).
- Flanagan, S.W., Moseley, P.L., and Buettner, G.R. (1998). Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.* 431,285-6.

Galas, M.C., Dourlen, P., Bégard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., and Buée, L. (2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 281, 19296-19304.

Jiang, Q., Yang, X., Liu, B., Li, M., Qian, S., Zhao, L., Zhou, Z., and Sun G. (2013). Hyperthermia impaired human visual short-term Memory : an fMRI study. *Int. J. Hyperthermia* 29 :219-24.

Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett.* 399:344-9.

Ke, Y.D., Suchowerska, A.K., van der Hoven, J., De Silva, D.M., Wu, C.W., van Eersel, J., Ittner, A., Ittner, L.M. (2012). Lessons from tau-deficient mice. *Int J Alzheimers Dis.* 2012:873270.

Kuo, L.J., and Yang, L.X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 22:305-9.

Liu, X., Conner, H., Kobayashi, T., Kim, H., Wen F., Abe, S., Fang, Q., Wang, X., Hashimoto, M., Bitterman, P., and Rennard, S.I. (2005). Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33:121-9.

Lovell, M.A., Soman, S., and Bradley, M.A. (2011). Oxidatively modified nucleic acids in preclinical Alzheimer's disease (PCAD) brain. *Mech. Ageing Dev.* 132:443-8. doi: 10.1016/j.mad.2011.08.003.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat. Cell Biol.* 13(10):1161-9. doi: 10.1038/ncb2344.

Mantha, A.K., Sarkar, B., and Tell, G. (2013). A short review on the implications of base excision repair pathway for neurons: Relevance to neurodegenerative diseases. *Mitochondrion.* doi:pri: S1567-7249(13)00272-9. 10.1016/j.mito.2013.10.007.

Morano, K.A., Grant, C.M., and Moye-Rowley, W.S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Sig. Dev.* 90, 1157-1195.

Nunomura, A., Hofer, T., Moreira, P.I., Castellani, R.J., Smith, M.A., and Perry, G. (2009). RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol.* 118:151-66. doi: 10.1007/s00401-009-0508-1.

Nunomura, A., Moreira, P.I., Castellani, R.J., Lee, H.G., Zhu, X., Smith, M.A., and Perry, G. (2012). Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. *Neurotox. Res.* 22:231-48. doi: 10.1007/s12640-012-9331-x.

Olive, P.L., Banath, J.P., and Durand, R.E. (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122, 86 –94.

Papasozomenos, S.C. (1996). Heat shock induces rapid dephosphorylation of tau in both female and male rats followed by hyperphosphorylation only in female rats: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 66:1140-9.

Planel, E., Richter, K.E., Nolan, C.E., Finley, J.E., Liu, L., Wen, Y., Krishnamurthy, P., Herman ; M., Wang, L., Schachter, J.B., Nelson, R.B., Lau, L.F., and Duff, K.E.(2007) Anesthesia leads to tau hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. *J Neurosci.* 27, 3090-7.

Poulsen, H.E., Specht, E., Broedbaek, K., Henriksen, T., Ellervik, C., Mndrup-Poulsen, T., Tonnesen, M., Nielsen, P.E., Andersen, H.U., and Weimann, A. (2012). RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? *Free Radical Biology & Medicine* 52, 1353–1361.

Sjoberg, M.K., Shestakova. E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., and Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *J. Cell Sci.* 119, 2025–2034.

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Bueée, L., and Galas, M.C. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J. Biol. Chem.* 286:4566-75. doi: 10.1074/jbc.M110.199976.

Tucker, K. L., Meyer, M., Barde, Y.A. (2001) Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nature Neuroscience* 4, 29–37.

Wang, X., Michaelis, E.K. (2010). Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front. in Aging Neurosciences* 2:12. doi: 10.3389/fnagi.2010.00012.

Wei, Y., Qu, M.H., Wang, X.S., Chen, L., Wang, D.L., Liu, Y., Hua, Q., and He, R.Q. (2008). Binding to the Minor Groove of the Double-Strand, Tau Protein Prevents DNA from Damage by Peroxidation. *PLoS One* 3, 2600.

Zhang, N.N., Dudgeon, D.D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., and Cunningham, K.W. (2006) Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol. Biol. Cell* 17:3409-22.

7. Figures Legends

Figure 1. Fluorescence quantification in the nuclei of hippocampal neurons.

The elliptical selection tool of ImageJ was used to mark 20 to 30 representative nuclei based on DAPI staining. The immunofluorescence quantifications from the nuclear mean intensity fluorescence are expressed in gray values, and image analyses of the raw data were obtained with ImageJ and ZEN software programs.

Figure 2. Hyperthermia generates oxidative stress in WT and KO-Tau hippocampi.

Protein carbonyl groups generated by oxidative stress were visualized using immunolabeling after reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in sagittal sections of the hippocampus from WT and KO-Tau mice under control (C) or heat stress (HS) conditions. HS increased DNPH staining in WT and KO-Tau sections. *Scale bars* indicate 200 or 10 μm (zoom).

Figure 3. Nuclear Tau protects genomic DNA integrity from hyperthermia-induced damage. (A)

Nuclear extracts from the cortex and hippocampus of WT mice in the control (C) condition, after heat stress (HS) or after a 24-h recovery after HS (HS+24H) were analyzed using immunoblotting for Tau independent of phosphorylation (Tau) and Tau unphosphorylated at epitope S195-202 (Tau1). Lamin B and synaptophysin (SYP) were used as specific nuclear and cytoplasmic markers, respectively. **(B)** Densitometric analysis of Tau (normalized to lamin B) and Tau1 (normalized to total Tau) revealed an increase in Tau protein dephosphorylated at epitope S195-202 in the nuclei of neurons under HS. Twenty-four hours of recovery restored basal nuclear Tau levels. The data shown are the mean \pm S.D. of three different mice. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

Figure 4. Hyperthermia increases non-cytotoxic nucleic acid damage selectively in KO-Tau neurons. (A)

The effect of Tau deficiency on genomic DNA integrity was measured using a Comet assay in control (C) and heat-stress (HS) mice. The results are presented as the OTM from WT or KO-Tau cortices under C or HS conditions. Tau deficiency selectively promoted DNA damage accumulation and the majority of fragmentation under C and HS conditions. Each OTM value is the median value of 150 to 200 cells from three different cortices. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. **(B)** Representative images of the dentate gyrus (DG) and CA1 sagittal sections from seven-month-old KO-Tau mice subjected to TUNEL assay under C, HS and 24 h recovery after HS (HS+24H) conditions and analyzed using laser scanning confocal microscopy. Nuclei were detected with DAPI staining. HS induced a strong positive TUNEL staining selectively in DG

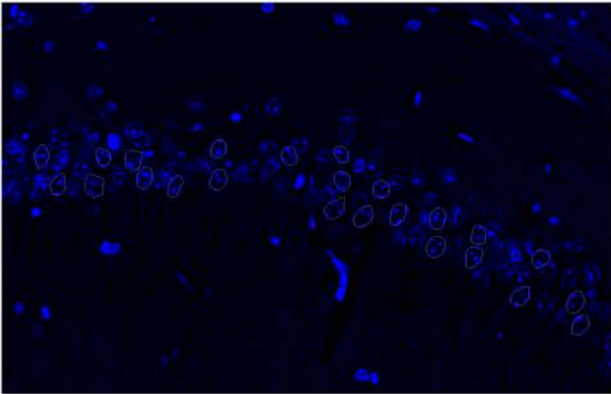
and CA1 KO-Tau neurons. The arrows indicate TUNEL-positive neurons. As a positive control, DG and CA1 sagittal sections from seven-month-old WT mice in control condition have been pretreated with a low concentration of DNase to create substrate for the end-labeling reaction. *The scale bars* indicate 20 μm . **(C)** The effect of Tau deficiency on nuclear nucleic acid integrity was detected using the TUNEL assay under C, HS or HS+24H conditions. The level of gray (0=black; 255=white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) in cells from whole WT hippocampi (HIP) or dentate gyrus (DG) and CA1 subfields from KO-Tau hippocampi. Tau deficiency clearly increased the averaged gray levels in the DG and CA1 regions in C and HS conditions. Twenty-four hours after HS, the gray level fully returned to basal levels in the nuclei from KO-Tau DG neurons but only partially decreased in the CA1 neurons, which shows the selective weakness of CA1 neurons compared with DG cells in the removal of HS-induced damage. The data shown are the mean \pm S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. **(D)** Quantification of DAPI-stained nuclei did not show significant changes in cell density in seven-month-old CA1 KO-Tau mice after HS or HS+24H. These data indicate that HS-generated nucleic acid damage did not promote cell death.

Figure 5. Tau deletion induces γ -H2AX accumulation under hyperthermia. H2AX phosphorylation was detected using an anti- γ -H2AX antibody in hippocampal sections from 7m WT and KO-Tau mice. **(A)** Representative images of sagittal DG and CA1 sections from WT and KO-Tau mice under control (C) or heat stress (HS) conditions labeled for γ -H2AX and analyzed using confocal microscopy are shown. DAPI stained the nuclear chromatin. HS induced a strong increase in γ -H2AX specifically in the KO-Tau hippocampus. *The scale bars* indicate 50 μm . **(B)** Nuclear extracts of the hippocampus from WT and KO-Tau mice in the C or HS condition were analyzed using immunoblotting for γ -H2AX. Lamin B was used as a specific nuclear loading protein. **(C)** Sagittal DG sections from WT and KO-Tau mice were subjected to a TUNEL assay, labeled with γ -H2AX and analyzed using confocal microscopy. Comparisons of TUNEL- γ -H2AX, TUNEL-DAPI and γ -H2AX-DAPI overlays highlighted the occurrence of double-strand breaks only in some nuclei (arrows). *Scale bars* indicate 10 μm . **(D)** Representative images of sagittal DG sections from 7-month-old KO-Tau mice 24 h after HS labeled for γ -H2AX and analyzed using laser scanning confocal microscopy. The nuclei were detected using DAPI staining. Nuclear γ -H2AX labeling returned to control levels in DG neurons, but discrete γ -H2AX foci persisted in the nuclei of CA1 neurons. *The scale bars* indicate 50 μm .

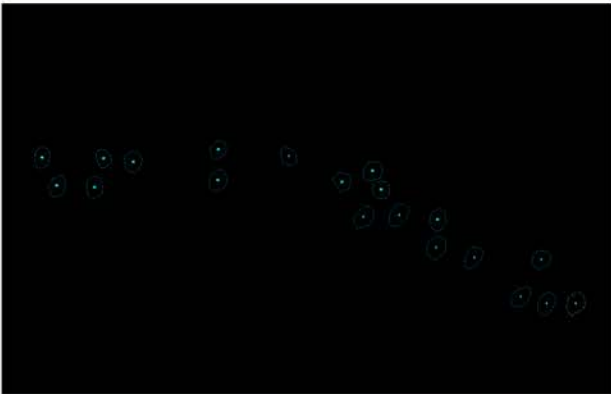
Figure 6. Hyperthermia causes DNA and RNA damage in Tau-deficient neurons. Sagittal hippocampus sections from KO-Tau mice subjected to heat stress (HS) were pre-treated or not with DNase-free RNase, RNase-free DNase or both before TUNEL staining and imaged using laser scanning confocal microscopy. RNase pre-treatment fully abolished cytoplasmic staining and reduced nuclear TUNEL staining levels. DNase pre-treatment fully abolished DAPI staining and reduced nuclear TUNEL staining. These data demonstrated that Tau deficiency induced nuclear DNA and cytoplasmic/nuclear RNA damage under HS.

Fig. 1

DAPI



ROI



Alexa 488

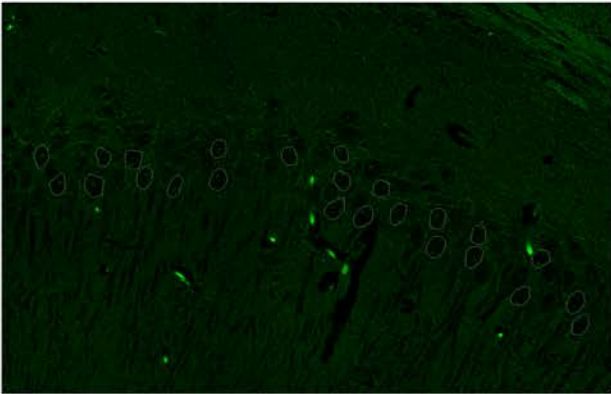


Fig. 2

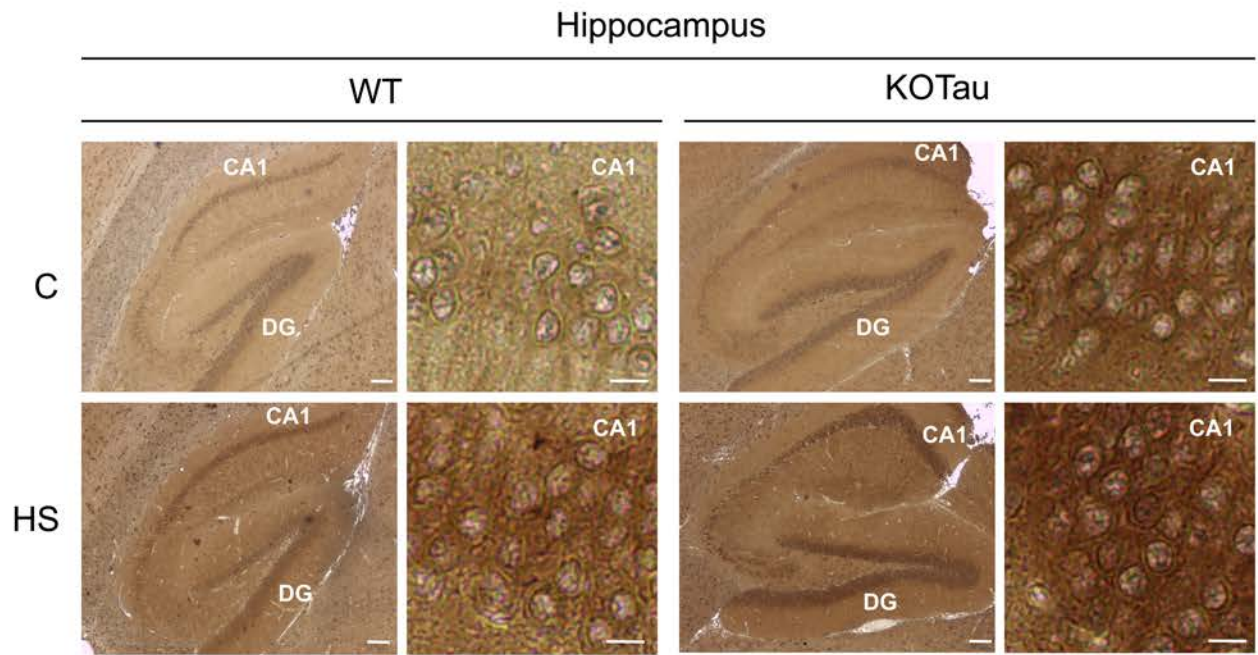


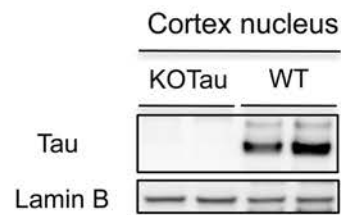
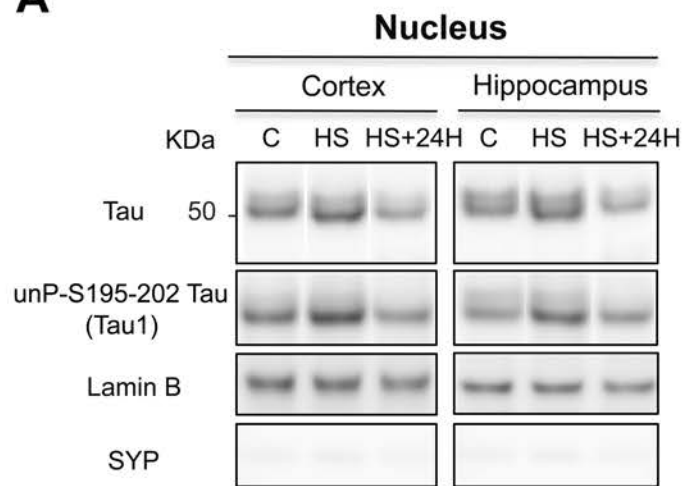
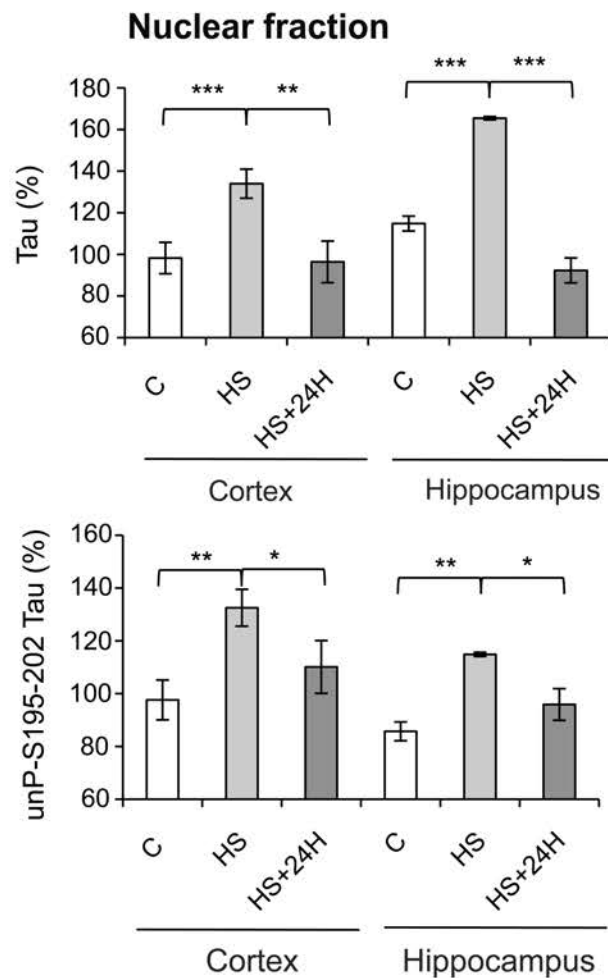
Fig. 3**A****B**

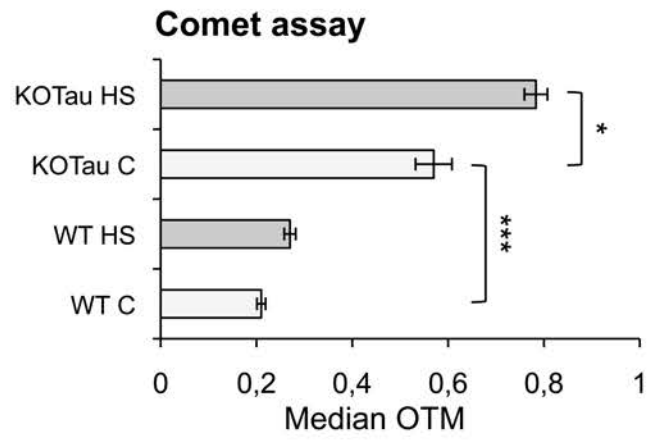
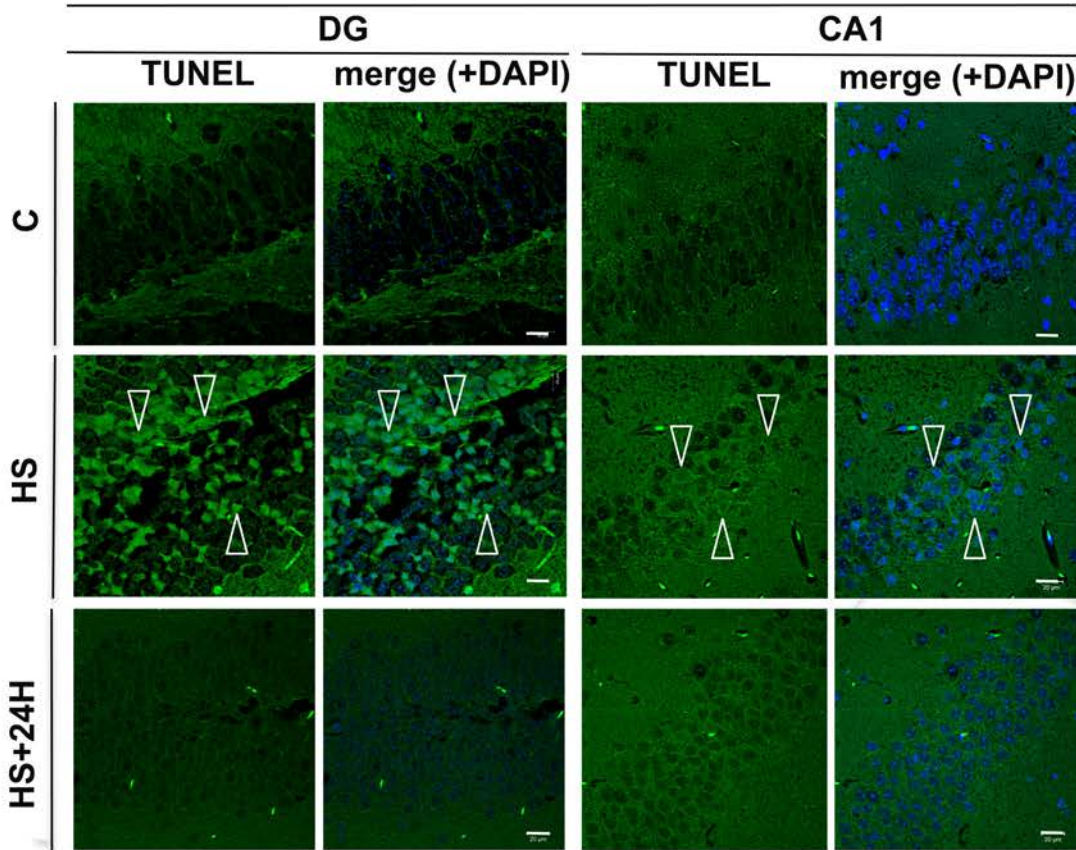
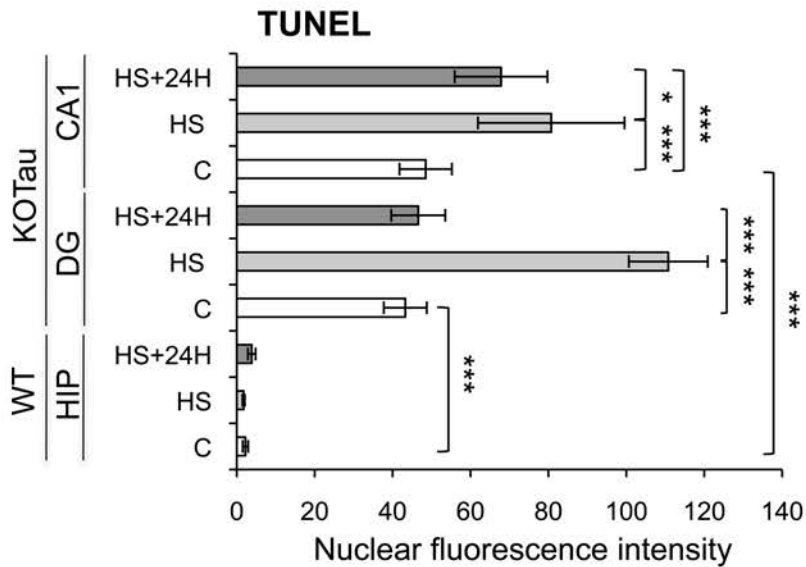
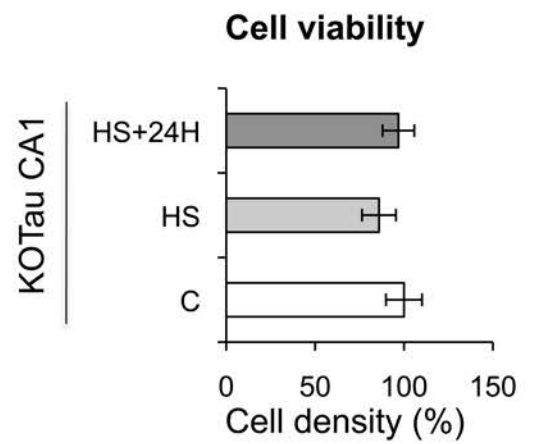
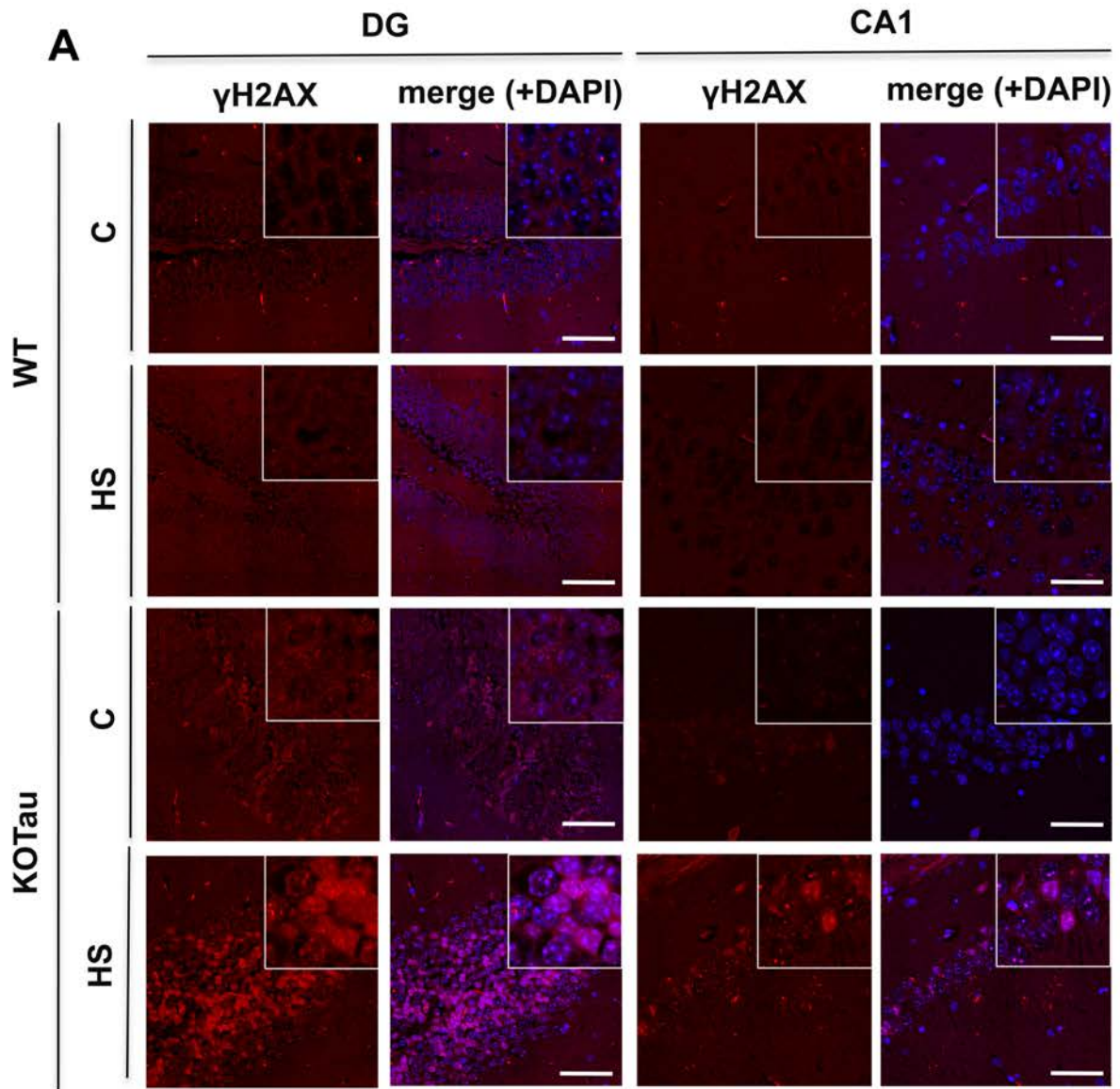
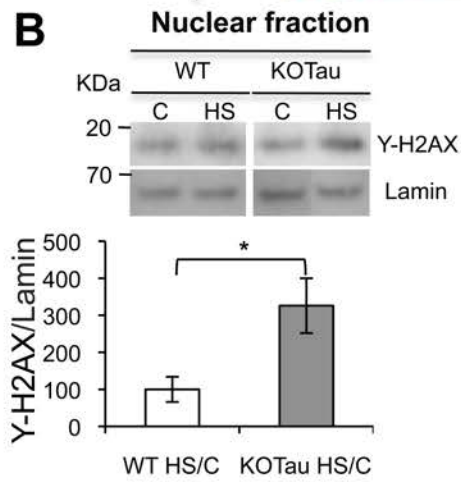
Fig. 4**A****B****KO Tau****C****D**

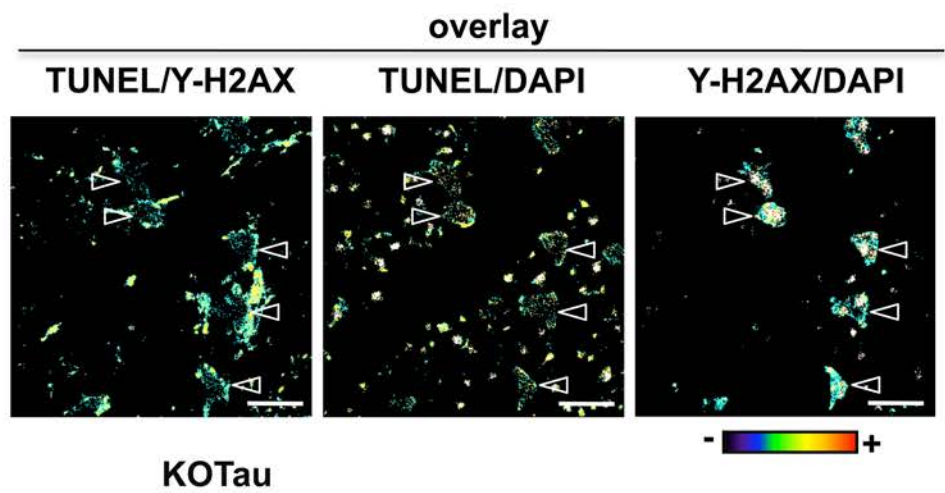
Fig. 5 A



B



C



D

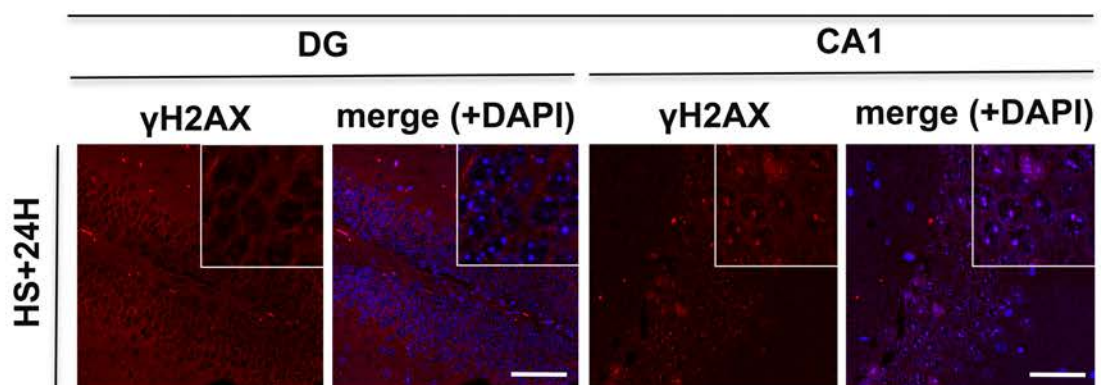
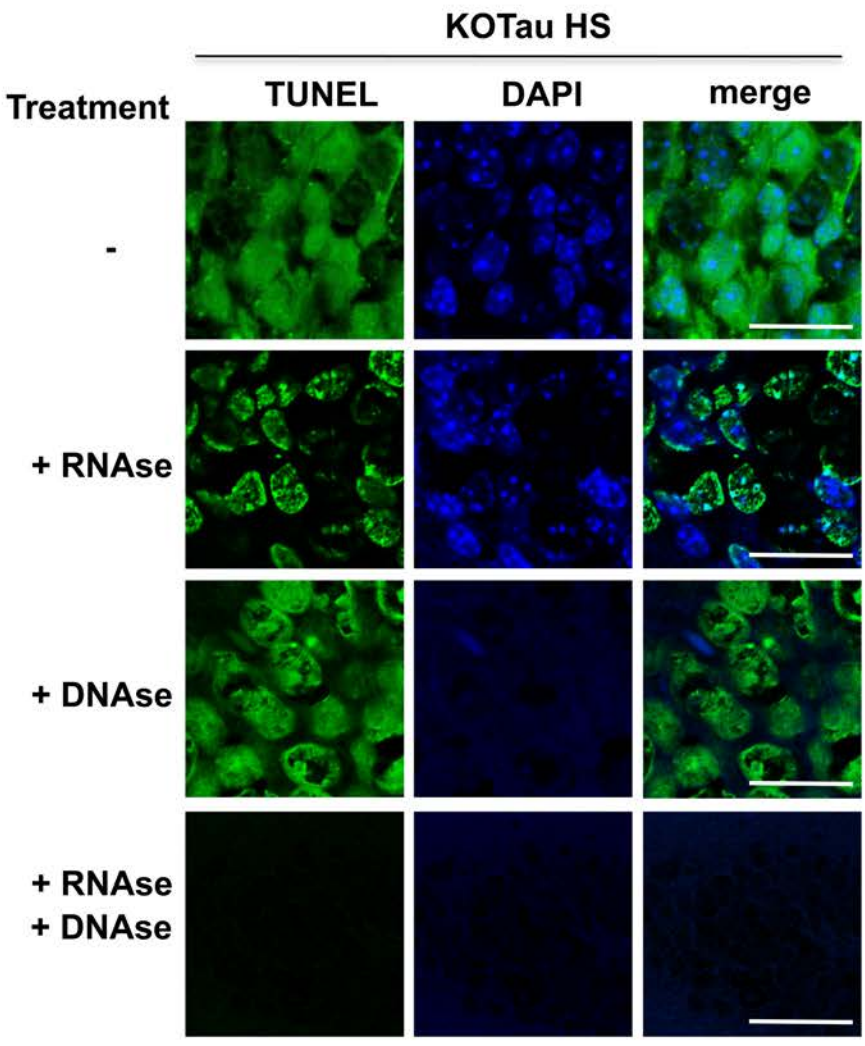


Fig. 6



II/ OLIGOMÉRIISATION DE TAU ET DOMMAGES AUX ACIDES NUCLÉIQUES INDUITS PAR UN STRESS HYPERTHERMIQUE DANS LE MODÈLE MURIN THY-TAU22

II.1/ OBJECTIFS

Les Tauopathies sont caractérisées par la présence de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée formant la dégénérescence neurofibrillaire. L'hypothèse que nous avons formulée est que la pathologie Tau pourrait altérer son rôle protecteur vis-à-vis des acides nucléiques dans les neurones.

C'est pourquoi nous avons étudié l'impact de différents stades de la pathologie Tau sur son rôle protecteur des acides nucléiques dans le modèle murin THY- Tau22.

II.2/ RÉSULTATS

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

Hyperthermia promotes Tau oligomerization and nuclear nucleic acid damage in an AD-like transgenic mouse model.

Marie Violet · Lucie Delattre · Meryem Tardivel · Audrey Sultan · Alban Chauderlier · Elodie Marciniak · Vincent Deramecourt · Sandrine Humez · Rakez Kayed · Lester Binder · Bruno Lefebvre · Eliette Bonnefoy · Luc Buée · Marie-Christine Galas

M. Violet and L. Delattre contributed equally in this work

M. Violet, L. Delattre, M. Tardivel, A. Sultan, A. Chauderlier, R. Caillierez, E. Marciniak, S. Humez, V. Deramecourt, B. Lefebvre, L. Buée, M.C. Galas (corresponding autor)

Inserm UMR837, Alzheimer and Tauopathies, 1 rue Michel Polonovski, 59045 Lille, France, Université Droit et Santé de Lille, Jean Pierre Aubert Research Centre, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Faculté de Médecine-Pôle Recherche, Lille, France, CHU-Lille, 59037 Lille, France,

e-mail : marie-christine.galas@inserm.fr

E. Bonnefoy- CNRS FRE 325, Régulation de la Transcription et Maladies Génétiques, Université Paris Descartes, 45 rue Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France.

S. Talahari, F. Nessler- Laboratoire de Toxicologie Génétique, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France

L. Binder- Department of Translational Science & Molecular Medicine, College of Human Medicine, Michigan State University, 333 Bostwick Ave NE, Van Andel Institute, Grand Rapids, Michigan 49503, USA.

R. Kayed - Departments of Neurology and Neuroscience & Cell Biology, George and Cynthia Mitchell Center for Neurodegenerative Diseases, University of Texas Medical Branch, 301 University Blvd, Medical Research Building, Room 10.138C, Galveston, Texas 77555-1045, USA

Key words (4-6 words)

Tau, oligomers, Reactive Oxygen Species, hyperthermia, nucleic acid damage, Alzheimer's disease

Abstract

The early stages of Alzheimer's disease (AD) are characterized by oxidative damage to nucleic acids in neurons demonstrating Tau pathology. Tau is widely known to play a role in microtubule dynamics. However, Tau is also a key nuclear player in the protection of neuronal genomic DNA integrity under ROS-inducing heat stress (HS) in cultured neurons. In the present work, using a TUNEL assay in an *in vivo* mouse model of tauopathy (THY-Tau22), we demonstrated that HS induced selective nuclear nucleic acid damage to hippocampal neurons during early stages of Tau pathology. Interestingly, the nuclei of these neurons were immunoreactive for Tau oligomers as indicated by their labeling with two antibodies, TOC1 and T22. Thus, HS-induced Tau oligomerization was strictly correlated to nucleic acid damage, suggesting a deleterious role of prefibrillar Tau oligomers in the impairment of nuclear nucleic acid integrity *in vivo*.

This study clearly highlights the existence of a critical early time window for HS-induced Tau oligomerization and nucleic acid vulnerability during the evolution of Tau pathology.

1. Introduction

An increase of oxidative DNA (Bradley-Whitman *et al.* 2013 ; Coppedé and Migliore 2009 ; Brasnjevic *et al.* 2008) and RNA (Nunomura *et al.* 2012 ; Lovell *et al.* 2011) damage occurs in a subset of vulnerable neurons exhibiting Tau pathology during the very early stages of Alzheimer's disease (AD). Altered DNA and RNA integrity is particularly harmful in differentiated neurons. Unrepaired nucleic acids can trigger transcriptional and translational deregulation, leading to reduced protein synthesis, protein mutation, the production of truncated proteins and genomic instability; therefore, nucleic acids play a key role in neuronal dysfunction. Early transcriptional deregulation and chromosomal instability have been widely documented in AD (Cooper-Knock *et al.* 2012) and accumulated DNA damage has recently been linked to cognitive decline in neurodegenerative disorders (Borgesius *et al.* 2012). However, the mechanisms responsible for the abnormal accumulation of reactive oxygen species (ROS)-induced nucleic acid damage in vulnerable neurons during the early stages of AD pathogenesis are poorly understood. Particularly, the potential role of Tau pathology, which is a hallmark of AD, in nucleic acid integrity has remained unexplored to date.

Tau pathology is characterized by time-dependent increased Tau phosphorylation to specific sites and abnormal conformation processes leading to aggregation into paired helical filaments (PHF) and, subsequently, neurofibrillary tangles (NFT). Recently, prefibrillar oligomers have emerged as a deleterious form of Tau, rather than larger aggregates (Flach *et al.* 2012 ; Lasagna-Reeves *et al.* 2011; Mufson *et al.* 2013), and have been linked to the early stages of AD pathology (Patterson *et al.* 2011 ; Lasagna-Reeves *et al.* 2012). However, the mechanisms governing the nucleation of Tau oligomers in AD pathology remain unknown.

In addition to its well-known role in microtubule assembly and stabilization, Tau has recently been shown to function as an essential nuclear player in the protection of neuronal genomic DNA integrity in ROS-producing heat stress (HS) (Sultan *et al.* 2011). Recently, using an *in vivo* model of hyperthermia/heat stress (HS) (Violet *et al.* submitted) we showed that Tau protects both genomic DNA and nuclear and cytoplasmic RNA integrity under ROS production.

We hypothesized that Tau pathology could alter its nuclear nucleic acid protective functions under ROS production and participate in the accumulation of genomic DNA and RNA damage in the AD brain.

We subjected a transgenic mouse of AD-like Tau pathology (THY-Tau22) to HS. We analyzed the effect of ROS production on nuclear nucleic acid integrity at various stages of Tau pathology in the hippocampus.

This study clearly highlighted the existence of an early and limited time window of nuclear nucleic acid vulnerability to HS during the development of Tau pathology.

Beside, we tested the effect of HS on the development of Tau pathology in the nuclei of neurons. Importantly, this study revealed the driving force with which HS induces selective Tau oligomerization in the nuclei of hippocampal neurons at early stages of Tau pathology. Our results demonstrate that HS-induced nuclear nucleic acid damage is strictly correlated with prefibrillar Tau oligomer formation.

Together, these results emphasize a toxic role of prefibrillar Tau oligomers in impaired nuclear nucleic acid integrity *in vivo* for the first time.

2. Material and methods

2.1. Animals

Heterozygous female THY-Tau22 and littermate wild-type mice were used. THY-Tau22 mice are characterized by overexpressed human 4-repeat Tau mutated at G272V and P301S under the control of Thy1.2 promoter (Schindowski *et al.* 2006). In THY-Tau22 mice, Tau pathology starts at three months in the subiculum/CA1 subfield, the first brain regions affected in AD, and from there spreads to the hippocampal dentate gyrus and cortex with age (Schindowski *et al.* 2006) All animals were kept in standard animal cages under conventional laboratory conditions (12 h/12 h light/dark cycle, 22°C), with *ad libitum* access to food and water. The animals were maintained in compliance with institutional protocols (Comité d'éthique en expérimentation animale du Nord Pas-de-Calais, n° 0508003). All experiments on animals were performed in compliance with, and following the approval of the local Animal Resources Committee (CEEA 342012 on December 12, 2012), standards for the care and use of laboratory animals, and French and European Community rules.

2.2. Post-mortem human brain

Human brain samples were obtained from the Lille Neurobank, which has been declared to the French Research Ministry by the Lille Regional Hospital (CHRU-Lille) on August 14, 2008 under the reference DC-2000-642. The Lille Neurobank fulfills criteria from the French Law on biological resources including informed consent, ethics review committee and data protection (article L1243-4 du Code de la Santé publique, August 2007). In this project, post-mortem human brain samples have been used for research purposes.

2.3. Heat-stressed mice

The *in vivo* mouse model of transient hyperthermic stress was used as previously described (Violet *et al.*, submitted). The mice were euthanized by cervical dislocation, and their brains were rapidly removed. For each brain, one hemisphere was post-fixed for 24 h in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. The hippocampus and cortex were dissected from the other hemisphere and used for biochemical analyses.

2.4. Immunofluorescence

Sagittal 5 μ M brain slices were deparaffinized and unmasked via citrate buffer (3.75 mM Acid citrate, 2.5 mM disodium phosphate, pH 6) for ten minutes in a domestic microwave. After 1 h of submersion in 1% horse serum (Vector Laboratories), primary antibodies were incubated overnight at 4°C in the presence of PBS-0.2% triton using the following antibodies: 80hDG (Santa Cruz Biotechnology), AT8 (Thermo Scientific), Tau pT212 (Life Technologies), MC1 (generously provided by Dr. Peter Davies), AT100 (Thermo Scientific), TOC1 (generously provided by Dr. Lester Binder), T22 (generously provided by Dr. Rakez Kayed) and Tau-410 (Sigma-Aldrich). AT8 and PT212 are two phospho-dependent antibodies that recognize the phosphorylated Ser202/pThr205 and phosphorylated Thr212 epitopes of Tau, respectively, which are present from the early to the late stages of Tau pathology. MC1 recognizes an abnormal conformation of Tau observed in early AD (Weaver *et al.* 2008) that is dependent on both amino acids 7–9 and 313–322. AT100 recognizes Tau phosphorylated at epitope Ser212/Thr214 and aggregated in sarkosyl-insoluble PHF (Zheng-Fischhöfer *et al.* 1998). Tau 410 recognizes C-terminal Tau sequence. TOC1, generously provided by Pr. L. Binder (Patterson *et al.* 2011; Ward *et al.* 2013) and T22, generously provided by Dr. R. Kayed (Lasagna-Reeves *et al.* 2012) specifically target prefibrillar Tau oligomers, For each antibody, the same settings were used for immunofluorescence acquisition in 3m, 5m and 7m THY-Tau22 mice and 7m WT mice.

These antibodies were revealed via secondary antibodies coupled to Alexa 488 or 568 (Life Technologies). Sections were counterstained and mounted with Vectashield/DAPI (Vector Laboratories).

2.5. Imaging systems and immunofluorescence quantification

Immunofluorescence acquisition and quantification on mouse slices were performed as previously described (Violet *et al.*, submitted).

Images of Human AD sections were captured using a wide-field microscope Zeiss Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Jena, Germany) with 20x Plan-Neofluar (0.5 NA) objective and equipped with a digital camera (Axio Cam MRm).

2.6. TUNEL staining

TUNEL staining was conducted on tissue slices as previously described (Violet *et al.*, submitted).

2.7. Cytoplasmic and nuclear fractionation of mouse brains

Mouse tissues were harvested in ice-cold buffer A (10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.15% NP-40) supplemented with protease inhibitors (Complete Mini-Roche) and phosphatase inhibitors (125 nM, okadaic acid and 1 mM orthovanadate). Tissues were mechanically homogenized with a 50 ml all glass homogenizer on ice and centrifuged at 100 g for one minute. The supernatant was collected, and a second homogenization was conducted. After centrifugation at 1000 g for ten minutes, the supernatant

was collected as the cytoplasmic fraction. Nuclei in the pellets were washed three times and then lysed in ice-cold RIPA buffer with protease inhibitors (Complete Mini-Roche) and phosphatase inhibitors (125 nM okadaic acid and 1 mM orthovanadate). After sonication, centrifugation at 12000 g at 4°C for 20 minutes yielded recovery of the supernatant as the nuclear fraction. The protein concentration was determined with a BCA assay kit.

2.8. CA1 isolation from brain slices

Mouse brains were quickly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (117 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 23 mM NaHCO₃, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂ and 25 mM glucose) and continuously oxygenated with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4). Transverse brain slices (400 µm) were cut using a Vibratome (Leica, Wetzlar, Germany). For each slice, CA1 was dissected using a scalpel under a binocular loupe (Leica MZ75) prior to subcellular fractionation.

2.9. Electrophoresis and immunoblotting

Electrophoresis and immunoblotting were performed as previously described (Sultan *et al.* 2011) using a Tau C-terminal antibody as previously described (Galas *et al.* 2006). The results are expressed as the means ± S.E.M. of three different mice. ImageJ software was used for quantification.

2.10. Statistics

Student's *t*-test (BiostaTGV software, Jussieu, France) was used to determine the significance (*p* value) between groups for immunoblotting and immunofluorescence analysis. A *p*-value <0.05 was considered to indicate a significant difference.

3. Results

Heat stress promotes nuclear nucleic acid damage in neurons expressing early Tau phosphorylation and misfolding. Based on our previous results obtained using KOTau mouse brains that indicated a role for Tau protein in the protection of DNA integrity during HS-dependent ROS production (Violet *et al.*, submitted), we hypothesized that Tau alteration could alter the nuclear nucleic acid-protective function of Tau under ROS-producing stress conditions and therefore could participate in the accumulation of DNA and RNA damage in AD pathology. We assessed the effect of HS on nuclear nucleic acid integrity associated with different stages of Tau pathology in hippocampal neurons from THY-Tau22 mice.

The effect of HS on nucleic acid integrity in CA1 of THY-Tau22 mice exhibiting various stages of Tau pathology, ranging from weak to moderate to severe, was investigated in mice of three (3m), five (5m) and seven (7m) months old. The effect of HS on nucleic acid integrity was also investigated in seven-month-old (7m) WT littermate mice.

First, the development of Tau pathology in CA1 was monitored in sagittal hippocampal sections of the hippocampi of THY-Tau22 and WT mice using antibodies specific to various AD-relevant Tau epitopes targeting phosphorylation and/or abnormal conformation (AT8, PT212, MC1, AT100) (Fig S1). In CA1 of THY-Tau22 mice, the amount of cytoplasmic Tau phosphorylation (AT8, PT212) and misfolding (MC1) *per* neuron, as well as the number of neurons exhibiting Tau pathology, increased from 3m to 7m. Almost no insoluble fibrillar Tau (AT100) was visible until 5m; the number of AT100-labeled neurons increased strongly by 7m. The 7m WT mice did not demonstrate Tau pathology.

To analyze the effect of HS on nuclear DNA and RNA integrity at different stages of Tau pathology, nuclear nucleic acid damage was analyzed using a TUNEL assay and imaged by laser scanning confocal microscopy in CA1 sections from 3m, 5m, 7m THY-Tau22 and 7m WT littermates under control (C), HS and 24 h recovery after HS (HS+24H) conditions. The quantification of TUNEL fluorescence in the nuclei (Fig 1a) revealed a specific HS-induced increase in nuclear nucleic acid damage in CA1 cells from 5m THY-Tau22 mice (\approx 4-fold in 5m THY-Tau22 HS vs. 5m THY-Tau22 C). In mice allowed to recover for 24 h after HS (HS+24H), nuclear TUNEL fluorescence partially decreased compared to levels observed in the HS condition (\approx 2-fold in 5m THY-Tau22 HS+24H vs. 5m THY-Tau22 HS). Noticeably, a lack of accumulation of nucleic acid damage in neurons exhibiting later-severe stage cytoplasmic Tau pathology, such as insoluble fibrillar Tau (AT100) was found in sagittal sections of CA1 from 5m (Fig S2d, white arrowhead) and 7m (Fig. S3) THY-Tau22.

A similar distinct effect between moderate and severe Tau phosphorylation (AT8) on TUNEL staining was observed in the cortex of the AD brain (Figure S3c), which confirmed that the THY-Tau 22 mouse model is valuable for investigations of the relationship between Tau pathology and nucleic acid integrity.

Until now, nucleic acid damage observed in AD brains was detected using immunolabeling for the nucleic acid oxidation biomarker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). The TUNEL assay was coupled with 8-OHdG immunolabeling (Kalyuzhny 2002) to further examine the involvement of oxidation in HS-induced nucleic acid fragmentation in CA1 neurons from 5m THY-Tau22 (Fig 1b). A strong correlation between the two staining methods was observed. No 8-OHdG labeling was detected in TUNEL-negative CA1 neurons from 7m THY-Tau22 mice (Fig. S3d). These results support the ability of HS to induce the oxidative stress-related fragmentation of nucleic acids *in vivo* in the nuclei of CA1 neurons during early stages of Tau pathology.

As previously observed in KOTau neurons (Violet *et al.*, submitted), HS-induced TUNEL staining was found in both the nucleus and the cytoplasm of CA1 neurons from 5m THY-Tau22 mice (Fig 1b); this

finding indicated that HS-induced DNA and RNA damage during early Tau pathology was similar to that previously observed in KOTau mice.

No cell loss was observed in the early (HS) or late (HS+24H) phases of the stress response in 5m THY-Tau22 CA1 neurons (Fig. S2e).

3.1. Effect of heat stress on the development of Tau pathology in nucleic acid-damaged nuclei.

To test the effect of HS on the development of nuclear Tau pathology and its relationship to nuclear nucleic acid damage, sagittal sections of the CA1 subfield of the hippocampi from 5m THY-Tau22 mice were subjected both to TUNEL assay and immunolabeling for AT8 (Fig. S2a), PT212 (Fig. S2b), MC1 (Fig. S2c), AT100 (Figure S2d) antibodies.

AT8, PT212, MC1, AT100 stainings were quantified in CA1 nuclei (Fig. 2a). Increases in TUNEL staining observed directly following HS were correlated to a slight increase in pathological Tau phosphorylation labeling in the nuclei of CA1 neurons, as observed using AT8 (1.9-fold 5m THY-Tau22 HS vs. 5m THY-Tau22 C) and PT212 (3.3-fold 5m THY-Tau22 HS vs. 5m THY-Tau22 C) antibodies. A slight but not statistically significant increase in early Tau misfolding was detected using MC1 antibodies. Interestingly, after a 24 h recovery after HS, the levels of Tau phosphorylation persisted (AT8) or slightly increased (PT212: 1.3-fold 5m THY-Tau22 HS+24H vs. 5m THY-Tau22 HS), but early misfolding (MC1) was greatly increased (3.6-fold 5m THY-Tau22 HS+24H vs. 5m THY-Tau22 HS). In contrast, HS did not promote the formation of PHF Tau (AT100).

To determine whether HS-induced increases in nuclear Tau phosphorylation and misfolding were related to an increase of Tau in neuronal nuclei, immunolabeling in the CA1 subfield of 5m THY-Tau22 mice was performed using a phospho- and conformation-independent Tau (total Tau) antibody and quantified in Fig. 2b. No significant changes in the level of nuclear Tau was observed neither after HS nor 24H recovery after HS.

In parallel, immunoblotting using a phospho- and conformation-independent Tau (total Tau) antibody was performed and quantified in nuclear extracts from isolated CA1 subfields of WT and 5m THY-Tau22 mice that were or were not exposed to HS (Fig. 2c). HS promoted the nuclear accumulation of total Tau in WT CA1 neurons, as previously described in the whole hippocampus (Violet *et al.* submitted). Conversely, HS did not significantly modify the level of Tau in nuclear extracts of CA1 cells from 5m THY-Tau22, confirming the results obtained from immunofluorescence (Fig. 2b). These results showed that the HS-induced increase of Tau phosphorylation and misfolding was not related to an increase of total Tau into the nuclei of neurons.

Altogether, these results indicated that HS quickly but weakly increased Tau phosphorylation; however, it strongly catalyzed MC1 misfolding in a later phase of the stress response.

Heat stress induces the formation of prefibrillar Tau oligomers selectively in neurons demonstrating nucleic acid damage

The intriguing selectivity of moderate Tau pathology, observed in prefibrillar Tau neurons from 5m THY-Tau22 mice, to mediate nuclear acid alteration suggested that harmful forms of Tau might be induced by ROS-producing stress in early rather than in late stages of the disorder. Based on compelling evidence indicating that prefibrillar Tau oligomers mediate Tau toxicity rather than larger aggregates, we hypothesized that Tau oligomers may be related to nucleic acid alteration.

We first tested the ability of HS to induce nuclear Tau oligomers *in vivo* by immunohistochemical analysis and confocal microscopy using TOC1 and T22 antibodies in CA1 neurons from WT and 3m, 5m and 7m THY-Tau22 mice. TOC1 (Fig. 3a) and T22 (Fig. 3b) immunolabelings were quantified in the nuclei of CA1 neurons. HS selectively induced Tau oligomerization in CA1 neurons from 5m THY-Tau22 mice (TOC1: 2.7-fold HS vs. C; T22: 5.6-fold HS vs. C), and the level of Tau oligomers greatly increased after a 24 h recovery following HS (TOC1: 1.7-fold HS+24H vs. HS; T22: 2.4-fold HS+24H vs. HS).

A three-dimensional reconstruction of the TOC1 immunofluorescence confocal microscopy z-series demonstrated the presence of Tau oligomers through a whole sagittal section of the CA1 hippocampal subfield of 5m THY-Tau22 mice (Fig. S4a). Notably, a higher magnification of the 3D reconstruction (Fig. S4b) indicated that the nuclear distribution of Tau oligomers redistributed from a low, diffuse labeling, which was observed after HS, to a cortical ring and dense internal foci observed after 24 h of recovery following HS. In parallel, a three-dimensional reconstruction of TOC1 immunofluorescence confocal microscopy z-series was performed in WT CA1 neurons and did not demonstrate HS-induced effects on Tau oligomerization (Fig. S4c).

3.2. Effect of heat stress on cellular Tau pathology in nucleic acid-damaged neurons

To analyze the effect of HS on Tau pathology in the neuronal somata more globally, AT8, PT212, MC1, AT100, TOC1 and T22 labelings were quantified in the entire CA1 cellular layer from 5m THY-Tau22 mice (Fig. S5). Similar HS-induced effects on Tau phosphorylation (AT8, PT212), Tau misfolding (MC1) and Tau oligomerization (TOC1, T22) were observed in the whole cell body as those observed in the neuronal nuclei. HS did not promote Tau fibrillarization (AT100) in the body of CA1 neurons from 5m THY-Tau22 mice.

3.3. Correlation between nucleic acid damage and Tau oligomerization

To test the potential relationship between HS-induced Tau oligomers and nucleic acid alteration, TUNEL staining and TOC1 and T22 immunolabelings were co-performed in sagittal sections of CA1 from

5m THY-Tau22 mice (Fig. 4). HS-induced Tau oligomers were strongly correlated with TUNEL-positive staining.

These results indicated a close relationship between the vulnerability of nucleic acid to HS and the generation of Tau oligomers in the nuclei of CA1 neurons in the early stages of Tau pathology.

Interestingly, a similar correlation was observed in the cytoplasm of nucleic acid-damaged neurons.

3.4. Heat stress-induced Tau oligomerization and nucleic acid damage is a common feature of CA1 and DG hippocampal neurons

In addition to neurons in the CA1 subfield, granular neurons of the DG are also prone to neurodegeneration in several tauopathies, such as Pick's disease. In AD, neurodegeneration first affects neurons of the CA1 subfield of the hippocampus, whereas granule cells of the DG withstand neurodegeneration until the late stages of pathology (Ohm 2007). Similarly, THY-Tau22 mice develop delayed Tau pathology in the DG compared to CA1 (Schindowski *et al.* 2006).

In 7m THY-Tau22 mice, whereas numerous CA1 neurons exhibited late Tau pathology (Fig. 3), granular neurons of the DG demonstrated moderate phosphorylated and misfolded Tau but no PHF (data not shown), reflecting an earlier stage of pathology, similar to that observed in CA1 of 5m THY-Tau22 mice.

To examine whether HS-induced nuclear nucleic acid alteration and Tau oligomerization were not selective to CA1 neurons, a TUNEL assay and immunoblotting for TOC1 were co-performed in granular neurons of the DG from 7m THY-Tau22 mice (Fig. 5a,b).

In the DG, as well as in CA1 neurons expressing early Tau pathology, HS induced nuclear nucleic acid fragmentation that partly decreased 24 h after HS (\approx 2.5-fold in HS+24H vs. HS) (Fig. 5a,b). As previously observed in CA1 neurons of 5m THY-Tau22 mice, HS-induced nucleic acid damage was correlated with an increase of Tau oligomer levels (Fig. 5a,b). However, in contrast to CA1 neurons, the level of Tau oligomers slightly decreased 24 h after recovery. Similar results were also observed in the cytoplasm of 7m DG neurons.

Notably, HS exhibited a reduced ability to potentiate Tau oligomerization in the DG compared to CA1 neurons during the late response to stress (summarized in Fig. 5c).

4. Discussion

4.1. An inducing role of ROS-producing stress in Tau oligomerization

Although soluble Tau oligomers have emerged as the pathogenic species in AD, as opposed to other larger aggregates, the pathological mechanisms driving Tau oligomerization *in vivo* are generally unknown (Hawkins *et al.* 2013 ; Blair *et al.* 2013). Evaluating the mechanisms underlying Tau

oligomerization in the brain may further improve our understanding of the roots of early neuronal dysfunction observed in AD. Oxidative stress has been shown to induce Tau oligomerization in *in vitro* and in cellular models (Schweers *et al.* 1995 ; Reynolds *et al.* 2005 ; Santa-Maria *et al.* 2005 ; Vanhelmont *et al.* 2010). Using two recently described antibodies that specifically recognize prefibrillar Tau oligomers (Ward *et al.* 2013; Lasagna-Reeves *et al.* 2012), we demonstrated that mild HS, which produces effects that are similar to those caused by oxidative stress in neurons (Galas *et al.* 2006; Sultan *et al.* 2011; Violet *et al.* submitted) induces nuclear and cytoplasmic Tau oligomerization *in vivo* in hippocampal neurons.

Oxidative stress has long been described as an important player in AD pathogenesis (Nunomura *et al.* 2006 ; Sultana *et al.* 2010 ; Sutherland *et al.* 2013). In the present study, prefibrillar Tau oligomers were observed exclusively in heat stressed neurons exhibiting early pathological Tau phosphorylation and misfolding. These observations support the previously reported role of phosphorylation and the prerequisite MC1 conformation in the Tau oligomerization process (Wang *et al.* 2007 ; Bibow *et al.* 2011; Nübling *et al.* 2012). The absence of small oligomeric forms in neurons bearing fibrillar Tau (PHF) suggests that HS-induced Tau oligomers may be quickly trapped by these larger aggregates or that ROS production in these neurons is not sufficient to trigger Tau oligomerization (Nunomura *et al.* 2001). Our results strongly suggest that an increase in ROS represents a driving force in the Tau oligomerization process during the early stages of AD pathogenesis. Nevertheless, we cannot rule out that additional effects induced by HS may be involved.

Interestingly, oxidative stress has also been shown to be involved in Abeta peptide oligomerization in an APP transgenic mouse model of AD (Murakami *et al.* 2011) and might play a similar catalyzing role in the formation of toxic oligomeric forms for Tau as well as for Abeta, the two key actors in AD.

Hippocampal neurons are variably susceptible to oxidative stress and Tau pathology. In AD, Tau pathology primarily affects neurons in the CA1 subfield of the hippocampus, whereas granule cells in the DG are more resistant to neurodegeneration. Interestingly, hippocampal neurons of the CA1 subfield demonstrated a greater vulnerability to HS-induced Tau oligomerization than granular neurons of the DG. Although a similar rapid HS-induced Tau oligomerization was observed in both regions, indicating that the early effect of stress on Tau polymerization is cell-type-independent, in the later response to stress, the level of Tau oligomers was strongly increased in CA1 neurons, whereas it was slightly decreased in DG neurons. A reduction of detected Tau oligomers in the DG might reflect either a loss of affinity of the two tested antibodies for oligomeric entities, potentially caused by conformational changes and/or higher polymerization, or a reversibility of Tau oligomerization. Interestingly, the reversibility of Tau aggregation had been previously described in cellular (Khlistunova *et al.* 2007) and *in vivo* models (Hochgräfe *et al.* 2013). Therefore, our data suggest that ROS-induced Tau oligomerization might partially explain the increased vulnerability of CA1 neurons compared to DG neurons in AD.

4.2. Relationship between altered Tau and nuclear nucleic acid integrity

The accumulation of Tau oligomers in neurons might impair the long-term functionality of Tau in oxidative conditions. In the THY-Tau22 AD-like Tau pathology mouse model, similar heat stress-induced selective nucleic acid damage was observed in hippocampal neurons exhibiting early Tau phosphorylation and conformational changes prior to fibrillarization (PHF). Interestingly, the accumulation of nucleic acid markers of oxidative stress has been widely reported in the AD brain at the onset of disease pathology (Lovell *et al.* 2007 ; Lovell *et al.* 2011 ; Nunomura *et al.* 2009 ; Murakami *et al.* 2011).

Nuclear nucleic acid damage was strictly correlated with the accumulation of prefibrillar Tau oligomers, which emphasized a deleterious relationship between Tau oligomerization and nucleic acid alteration in neurons, suggesting that prefibrillar Tau oligomers could alter the nucleic acid-protective functions of Tau similarly to Tau deficiency. Furthermore, this study demonstrated that the heat stress-induced nuclear accumulation of Tau oligomers and nucleic acid damage occurred during a short time period between the appearance of early Tau phosphorylation and misfolding and the later formation of insoluble PHF (Fig. 6).

However, the causal relationship between Tau oligomerization and nucleic acid damage remains unclear. We and others have reported that Tau interacts with DNA (Sjoberg *et al.* 2006 ; Wei *et al.* 2008; Sultan *et al.* 2011). Deregulation of the interaction between key proteins and DNA has been suggested to play an important role in the etiogenesis of neurodegenerative diseases (Camero *et al.* 2013a). It has been previously demonstrated *in vitro* that monomers and small oligomers interact with DNA (Camero *et al.* 2013b) but aggregation impairs Tau binding to DNA (Hua and He 2002; Camero *et al.* 2013b). Nevertheless Tau oligomerization may alter Tau's ability to complex with DNA and therefore underlie the loss of its DNA-protective function.

Conversely, *in vitro*, it has been shown that the binding of Tau to RNA and DNA accelerated the formation of Tau filaments (Kampers *et al.* 1996 ; Hikosou *et al.* 2007 ; Yin *et al.* 2009). Furthermore, Tau aggregation has been proposed to be mediated through its interaction with stress granules (Wolozin ; 2012), which are reversible cytoplasmic aggregates of RNA-binding proteins that are generated to sequester and/or degrade mRNAs during the cellular stress response.

Consequently, Tau oligomers and damaged nucleic acid might act synergistically in the nuclei of neurons to create a vicious circle contributing to the early potentiation of AD pathogenesis.

The underlying mechanisms involved in nuclear oligomeric Tau accumulation are currently unknown. Our data suggest that Tau might be directly phosphorylated, misfolded and oligomerized inside the nucleus under stress conditions as opposed to stress-induced oligomers being shuttled from the cytoplasm to the nucleus.

Although stress-induced Tau oligomers were diffusely distributed throughout the nucleoplasm, we observed an increase and a relocalization of Tau oligomers to nuclear clusters after 24 h of recovery. Surprisingly, this observation was correlated with a decrease in nuclear nucleic acid damage, which

suggests that the gathering of Tau oligomers may represent a mechanism by which oligomeric toxicity is decreased. As Tau oligomers can promote fibril formation at high concentrations, it is tempting to speculate that clusters of Tau oligomers might participate in their aggregation into inert higher-molecular-weight entities in the nuclei of neurons.

5. Conclusion

The early stages of Alzheimer's disease (AD) are characterized by specific mechanisms that induce neuronal impairment and contribute to the development of pathology. Understanding precocious pathological mechanisms is essential to deciphering the factors that trigger AD and shed light on new therapeutic targets. This report supports oxidative stress as playing an essential role in early AD pathogenesis.

It has been previously reported that Tau oligomers are associated with altered membrane integrity (Flach *et al.* 2012), dysfunctional ubiquitin-proteasome systems (Tai *et al.* 2012), altered synaptic and mitochondrial functions and cognitive decline early in the disease. The present study connected Tau oligomers to nucleic acid alterations in the nuclei of neurons and expanded their deleterious effects on neurons. Interestingly, hyperthermia like fever or heat exposure has been linked in humans to memory impairment (Racinais *et al.* 2008; Gaoua *et al.* 2011; Jiang *et al.* 2013) and in worsening of AD pathology (Fabiszewski *et al.* 1990). From our data it is tempting to speculate that an increase of prefibrillar Tau oligomers and nucleic acid alteration might be involved in these conditions.

Our results identified a critical time window for stress-induced Tau oligomerization and nucleic acid alteration. Neurons that are vulnerable to HS specifically demonstrated early pathological Tau phosphorylation and misfolding preceding fibrillization. This finding suggests the existence of a short therapeutic window, during which it may be possible to prevent and/or reverse the formation of toxic Tau oligomers and nucleic acid damage to block, or at least slow, the progression of AD pathology. Indeed, immunotherapeutic (Castillo-Carranza *et al.* 2013) and chemical (Hosokawa *et al.* 2012) strategies have highlighted Tau oligomers as promising therapeutic targets to prevent the development of AD.

6. Footnote

This article is dedicated to the late Pr. Lester Binder who was a pioneer in studying the atypical nuclear functionality of Tau.

7. Acknowledgements

This study was principally supported by the french government funding Agence Nationale de la Recherche MALZ EPITAUDNA grant and in part by the LabEx (excellence laboratory), Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's Disease), and INSERM.

Many thanks to ML. Caillet-Boudin for supportive discussions. We are grateful to the IMPRT (Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Lille) for access to the confocal microscopy Platform and animal facility Platform. We thank M. Besegher, I. Brion, D. Cappe, J. Devassine, Y. Lepage, and D. Taillieu for animal care, and D. Blum for animals management. We thank MH. Gevaert and RM. Siminski (Laboratoire d'histologie, Faculté de Médecine, Lille), M. Sendid, N. Zommer, C. Bournonville and S. Carrier for technical assistance. We express gratitude to AD patients and their families who allowed brain autopsy.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

8. References

- Aas PA, Otterlei M, Falnes PO, Vågbø CB, Skorpen F, Akbari M, Sundheim O, Bjørås M, Slupphaug G, Seeberg E, Krokan HE (2003) Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 20;421:859-63
- Bibow S, Mukrasch MD, Chinnathambi S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2011) The dynamic structure of filamentous tau. *Angew Chem Int Ed Engl* 50:11520-4. doi: 10.1002/anie.201105493
- Blair LJ, Nordhues BA, Hill SE, Scaglione KM, O'Leary JC 3rd, Fontaine SN, Breydo L, Zhang B, Li P, Wang L, Cotman C, Paulson HL, Muschol M, Uversky VN, Klengel T, Binder EB, Kaye R, Golde TE, Berchtold N, Dickey CA (2013) Accelerated neurodegeneration through chaperone-mediated oligomerization of tau. *J Clin Invest* 123:4158-4169
- Borgesius NZ, de Waard MC, van der Pluijm I, Omrani A, Zondag GC, van der Horst GT, Melton DW, Hoeijmakers JH, Jaarsma D, Elgersma Y (2011) Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair. *J Neurosci* 31:12543-53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1589-11.2011
- Bradey-Whitman MA, Timmons MD, Beckett TL, Murphy MP, Lynn BC, Lovell MA (2013) Nucleic Acid Oxidation: An early feature of Alzheimer's disease. *J Neurochem* [Epub ahead of print] doi: 10.1111/jnc.12444
- Brasnjevic I, Hof PR, Steinbusch HW, Schmitz C (2008) Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. 7:1087-97. doi: 10.1016 /j.dnarep.2008.03.010
- Camero S, Benítez MJ, Jiménez JS (2013) Anomalous protein-DNA interactions behind neurological disorders. *Adv Protein Chem Struct Biol* 91:37-63. doi: 10.1016/B978-0-12-411637-5.00002-0

- Camero S, Benítez MJ, Barrantes A, Ayuso JM, Cuadros R, Avila J, Jiménez JS (2013) Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features which are Similar to those Found in Histone-DNA Complex. *J Alzheimers Dis.* 2013 Nov 19. [Epub ahead of print]
- Castillo-Carranza DL, Lasagna-Reeves CA, Kaye R (2013) Tau aggregates as immunotherapeutic targets. *Front Biosci (Schol Ed)* 5:426-38
- Coppede F, Migliore L (2009) DNA damage and repair in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res* 6, 36-47
- Cooper-Knock J, Kirby J, Ferraiuolo L, Heath PR, Rattray M, Shaw PJ (2012) Gene expression profiling in human neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 8:518-30. doi: 10.1038/nrneuro.2012.156
- Fabiszewski KJ, Volicer B, Volicer L (1990) Effect of antibiotic treatment on outcome of fevers in institutionalized Alzheimer patients. *JAMA* 263 : 3168-72
- Flach K, Hilbrich I, Schiffmann A, Gärtner U, Krüger M, Leonhardt M, Waschipky H, Wick L, Arendt T, Holzer M (2012) Tau oligomers impair artificial membrane integrity and cellular viability. *J Biol Chem* 287:43223-33. doi: 10.1074/jbc.M112.396176
- Flanagan SW, Moseley PL, Buettner GR (1998) Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett*, 431,285-6
- Gaoua N, Racinais S, Grantham J, El Massioui F (2011) Alterations in cognitive performance during passive hyperthermia are task dependent. *Int J Hyperthermia* 27 :1-9
- Galas MC, Dourlen P, Bégarde S, Ando K, Blum D, Hamdane M, Buée L (2006) The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J Biol Chem* 281, 19296-19304
- Hawkins BE, Krishnamurthy S, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Prough DS, Jackson GR, Dewitt DS, Kaye R (2013) Rapid Accumulation of Endogenous Tau Oligomers in a Rat Model of Traumatic Brain Injury: Possible Link Between TBI and Sporadic Tauopathies. *J Biol Chem* 288(23):17042-50. doi: 10.1074/jbc.M113.472746
- Hikosou R, Kurabayashi Y, Doumoto M, Hoshitoku K, Mizushima F, Minoura K, Tomoo K, Ishida T (2007) Effect of DNA on filament formation of tau microtubule-binding domain: structural dependence of DNA. *Chem Pharm Bull* 55:1030-3
- Hochgräfe K, Sydow A, Mandelkow EM. Regulatable transgenic mouse models of Alzheimer disease: onset, reversibility and spreading of Tau pathology. *FEBS J.* 2013 Sep;280(18):4371-81. doi: 10.1111/febs.12250
- Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M (2012) Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. *PLoS One* 7:e52389. doi: 10.1371/journal.pone.0052389
- Hua Q, He RQ (2002) Effect of phosphorylation and aggregation on tau binding to DNA. *Protein Pept Lett* 9: 349-357
- Jiang Q, Yang X, Liu B, Li M, Qian S, Zhao L, Zhou Z, Sun G (2013) Hyperthermia impaired human visual short-term Memory : an fMRI study. *Int J Hyperthermia* 29 :219-24

- Kalyuzhny AE (2002) Simultaneous in situ detection of DNA fragmentation and RNA/DNA oxidative damage using TUNEL assay and immunohistochemical labeling for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). *Methods Mol Biol* 203:219-34
- Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett* 399:344-9
- Khlistunova I, Pickhardt M, Biernat J, Wang Y, Mandelkow EM, Mandelkow E (2007) Inhibition of Tau aggregation in cell models of tauopathy. *Curr Alzheimer Res.* 4:544-6
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kaye R (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 6:39. doi: 10.1186/1750-1326-6-39
- Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, Kaye R (2012) Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J* 26:1946-59. doi: 10.1096/fj.11-199851
- Liu X, Conner H, Kobayashi T, Kim H, Wen F, Abe S, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Bitterman P, Rennard SI (2005) Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33:121-9
- Lovell MA, Markesbery WR (2007) Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 85:3036-40
- Lovell MA, Soman S, Bradley MA (2011) Oxidatively modified nucleic acids in preclinical Alzheimer's disease (PCAD) brain. *Mech Ageing Dev* 132:443-8. doi: 10.1016/j.mad.2011.08.003
- Mufson EJ, Ward S, Binder L (2013) Prefibrillar Tau Oligomers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis* [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24029627
- Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC, Aliev G, Smith MA, Perry G (2008) Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 44: 1493-1505
- Nübling G, Bader B, Levin J, Hildebrandt J, Kretschmar H, Giese A (2012) Synergistic influence of phosphorylation and metal ions on tau oligomer formation and coaggregation with α -synuclein at the single molecule level. *Mol Neurodegener.* 2012 7:35. doi: 10.1186/1750-1326-7-35
- Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, Hatsuta H, Murayama S, Barnham KJ, Irie K, Shirasawa T, Shimizu T (2011) SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286:44557-68. doi: 10.1074/jbc.M111.279208
- Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S, Chiba S, Atwood CS, Petersen RB, Smith MA (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:759-67
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 631-641
- Nunomura A, Hofer T, Moreira PI, Castellani RJ, Smith MA, Perry G (2009) RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 118:151-66. doi: 10.1007/s00401-009-0508-1

- Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G (2012) Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. *Neurotox Res* 22:231-48. doi: 10.1007/s12640-012-9331-x
- Papasozomenos SC (1996) Heat shock induces rapid dephosphorylation of tau in both female and male rats followed by hyperphosphorylation only in female rats: implications for Alzheimer's disease. *J Neurochem* 66:1140-9
- Ohm TG (2007) The dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 163 :723-740
- Patterson KR, Remmers C, Fu Y, Brooker S, Kanaan NM, Vana L, Ward S, Reyes JF, Philibert K, Glucksman MJ, Binder LI (2011) Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 286:23063-76. doi: 10.1074/jbc.M111.237974
- Poulsen HE, Specht E, Broedbaek K, Henriksen T, Ellervik C, Mndrup-Poulsen T, Tonnesen M, Nielsen PE, Andersen HU, Weimann A (2012) RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? *Free Radical Biology & Medicine* 52 (2012) 1353–1361
- Racinais S, Gaoua N, Grantham J (2008) Hyperthermia impairs short-term memory and peripheral motor drive transmission. *J Physiol* 586 : 4751-62
- Reynolds MR, Berry RW, Binder LI (2005) Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 44:1690-700
- Santa-Maria I, Hernandez F, Smith MA, Perry G, Avila J, Moreno FJ (2005) Neurotoxic dopamine quinone facilitates the assembly of Tau into fibrillar polymers. *Mol Cell Biochem* 278 : 203-212
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, Buée 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
- Schonheit B, Zarski R, Ohm TG (2004) Spatial and temporal relationships between plaques and tangles in Alzheimer-pathology. *Neurobiol Aging* 25: 697–711
- Schweers O, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E (1995) Oxidation of cysteine-322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:8463-7
- Sjoberg M K, Shestakova E, Mansuroglu Z, Maccioni RB, Bonnefoy E (2006) *J. Cell Sci* 119, 2025–2034
- Sultan A, Nessler F, Violet M, Bégard S, Loyens A, Talahari S, Mansuroglu Z, Marzin D, Sergeant N, Humez S, Colin M, Bonnefoy E, Bueée L, Galas MC (2011) Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *J Biol Chem* 286:4566-75. doi: 10.1074/jbc.M110.199976
- Sultana R, Butterfield DA (2010) Role of oxidative stress in the progression of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 19:341-53. doi: 10.3233/JAD-2010-1222
- Sutherland GT, Chami B, Youssef P, Witting PK (2013) Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox Rep.* 18:134-41. doi: 10.1179/1351000213Y.0000000052
- Tai HC, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spiers-Jones TL, Hyman BT (2012) The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* 181:1426-35. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.033

- Tucker K L, Meyer M, Barde YA (2001) Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nature neuroscience* 4: 29–37
- Vanhelmont T, Vandebroek T, De Vos A, Terwel D, Lemaire K, Anandhakumar J, Franssens V, Swinnen E, Van Leuven F, Winderickx J (2010) Serine-409 phosphorylation and oxidative damage define aggregation of human protein tau in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2010 Dec;10(8):992-1005. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00662.x
- Violet M, Delattre L, Tardivel M, Sultan A, Chauderlier A, Caillierez R, Talahari S, Nesslany F, Lefebvre B, Bonnefoy E, Buée L, Galas MC. Tau protects neuronal DNA and RNA under hyperthermia and oxidative stress (submitted).
- Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci.* 2007 Jan;25(1):59-68
- Ward SM, Himmelstein DS, Lancia JK, Fu Y, Patterson KR, Binder LI. TOC1: Characterization of a Selective Oligomeric Tau Antibody. *J Alzheimers Dis.* 2013 Jan 1;37(3):593-602. doi: 10.3233/JAD-131235
- Weaver CL, Espinoza M, Kress Y, Davies P (2000) Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21:719-27
- Wei Y, Qu MH, Wang XS, Chen L, Wang DL, Liu Y, Hua Q, He RQ (2008) *PLoS One* 3, 2600
- Wolozin B (2012) Regulated protein agrégation : stress granules and neurodegeneration. *Mol Neurodeg* 7 :56
- Yin J, Chen R, Liu C (2009) Nucleic acid induced protein aggregation and its role in biology and pathology. *Front Biosci* 14:5084-106
- Zhang NN, Dudgeon DD, Paliwal S, Levchenko A, Grote E, Cunningham KW (2006) Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. *Mol Biol Cell* 17:3409-22
- Zheng-Fischhöfer Q, Biernat J, Mandelkow EM, Illenberger S, Godemann R, 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

9. Figures

Fig. 1 Tau pathology selectively generated nucleic acid oxidative damage in the nuclei of neurons in the early stages of AD pathology. **(a)** The effect of Tau pathology on nuclear nucleic acid integrity was detected by TUNEL assay under control (C), HS or 24 h after HS (HS+24H) conditions. The level of gray (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells from seven-month-old WT and three- (3m), five- (5m) and seven- (7m) month-old THY-Tau22 mice. Tau pathology increased the averaged gray level in the HS condition in 5m THY-Tau22 mice. Gray levels only partially decreased after 24 h of recovery after HS. The data shown are the means \pm S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$.

(b) Representative images of sagittal CA1 sections from 5m THY-Tau22 mice subjected to TUNEL assay and co-stained with 8OHdG antibody and analyzed by laser scanning confocal microscopy. Nuclei were detected using DAPI staining. TUNEL-positive staining was strictly correlated to oxidative damage (arrows). *Scale bars* indicate 20 μ m.

Fig. 2 HS potentiates early Tau phosphorylation and misfolding in neuronal nuclei. **(a)** The effect of HS on Tau pathology was detected by labeling sagittal CA1 sections from 5m THY-Tau22 mice with phospho-dependent (AT8, PT212), conformational-dependent (MC1: early misfolded Tau) or both (AT100: hyperphosphorylated PHF) antibodies under control (C), HS or 24 h after HS (HS+24H) conditions, and analyzed by laser scanning confocal microscopy. The level of gray (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells from 5m THY-Tau22 mice. HS slightly increased pathological phosphorylation and early misfolding but had no effect on Tau aggregation (AT100). Later responses to HS (HS+24H) dramatically potentiated MC1 misfolding. The data shown are the means \pm S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$. **(b)** The effect of HS on Tau level was detected by labeling sagittal CA1 sections from 5m THY-Tau22 mice with total Tau antibody under control (C), HS or 24 h after HS (HS+24H) conditions, and analyzed by laser scanning confocal microscopy. The level of gray (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells from 5m THY-Tau22 mice. No increase of Tau level was observed in the nuclei of TUNEL-positive cells directly after HS or 24 h after HS. **(c)** Nuclear extracts of the CA1 subfield from 7m WT mice and 5m THY-Tau22 mice in the control (C) condition and after HS were analyzed by immunoblotting for total Tau. Lamin B was used as a specific nuclear marker. Densitometric analysis of total Tau (normalized to lamin B) revealed a statistically significant increase in Tau in the nuclei of WT neurons under HS. The data are shown as the means \pm S.D. of three different WT and THY-Tau mice. *, $p < 0.05$.

Fig. 3 HS generates prefibrillar Tau oligomers labeled with TOC1 and T22 antibodies in the early stages of Tau pathology. The effect of HS on Tau oligomerization was detected by labeling sagittal CA1 sections from 7m WT, 5m and 7m THY-Tau22 mice under control (C), HS or 24 h after HS (HS+24H) conditions with TOC1 **(a)** and T22 **(b)** antibodies, and analyzed by laser scanning confocal microscopy. The level of gray (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of CA1 cells. HS selectively increased the formation of prefibrillar Tau oligomers in 5m THY-Tau22 mice. A 24 h recovery

period potentiated Tau oligomerization. The data shown are the means \pm S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$.

Fig. 4 Prefibrillar Tau oligomers and nucleic acid damage co-localize in the same neurons. Representative images of sagittal CA1 sections from 5m THY-Tau22 mice that were subjected to TUNEL assay and labeled with TOC1 or T22 and analyzed by confocal microscopy. DAPI was used to stain chromatin in the nuclei. HS-induced TUNEL-positive staining (arrows) was correlated with an increase in Tau oligomers labeling both the early (HS) and late (HS+24H) stress response. *Scale bars* indicate 20 μm .

Fig. 5 HS-induced Tau oligomerization and nucleic acid damage is cell-type-independent in the hippocampus. **(a)** Representative images of sagittal DG sections from 7m THY-Tau22 mice subjected to TUNEL assay and labeled with TOC1 and analyzed by confocal microscopy. DAPI was used to stain chromatin in the nuclei. HS-induced TUNEL-positive staining (arrows) was correlated to a strong increase in Tau oligomers labeled in the early (HS) stress response. *Scale bars* indicate 50 μm . **(b)** The level of gray (0 = black; 255 = white) was quantified within the nuclei (based on DAPI detection) of DG cells from 7m THY-Tau22 mice. HS selectively increased the formation of prefibrillar Tau oligomers and nucleic acid damage in 7m THY-Tau22 mice. A 24 h recovery period potentiated Tau oligomerization. The data are shown as the means \pm S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$. **(c)** HS induces sustained Tau oligomerization selectively in CA1 neurons. Comparative diagram of HS-induced effects on nuclear nucleic acid integrity and Tau oligomerization in CA1 and DG neurons displaying early Tau pathology.

Fig. 6 Overview of HS-induced effects on nuclear nucleic acid integrity and Tau pathology. **(a)** Diagram summarizing the effect of HS on Tau pathology and nucleic acid integrity in CA1 cells from 5m THY-Tau22. **(b)** The general diagram summarizes the effect of HS on nuclear nucleic acid integrity and nuclear Tau oligomerization in THY-Tau22 mice during the development of Tau pathology.

Fig S1 Tau pathology increases with age in CA1 neurons from THY-Tau22 mice.

Representative images of sagittal CA1 sections from seven-month-old WT and three- (3m), five- (5m) and seven- (7m) month-old THY-Tau22 mice labeled with phospho-dependent (AT8, PT212) or conformational-dependent (MC1: early misfolded Tau) Tau or both (AT100: hyperphosphorylated and aggregated Tau) antibodies in the basal (C) condition and were analyzed by laser scanning confocal microscopy. Nuclei were detected with DAPI staining. All labelings increased with age. *Scale bars* indicate 20 μm .

Fig S2 HS-induced effect on nuclear Tau pathology.

Representative images of sagittal CA1 sections from 5m THY-Tau22 mice subjected to TUNEL assay and co-labeled with AT8 **(a)**, PT212 **(b)**, MC1 **(c)** and AT100 **(d)** and analyzed by confocal microscopy. *Scale*

bars indicate 20 μm . Nuclear TUNEL labeling strongly increased directly after HS (empty arrow) and decreased 24h recovery after HS **(a,b,c,d)**. Strong nuclear MC1 labeling was revealed in TUNEL-positive cells 24 h after HS **(c)**. Noticeably, rare neurons developing cytoplasmic AT100 labeling **(d, white arrowhead)** were TUNEL-negative. *Scale bars* indicate 20 μm . **(e)** Quantification of DAPI-stained nuclei did not reveal any statistical differences in cell density from 5m THY-Tau22 mice after HS or 24 h recovery after HS. HS-induced nucleic acid damage is non-cytotoxic.

Fig S3 Tau fibrillization prevents HS-induced nucleic acid damage.

Representative images of sagittal CA1 sections from 5m THY-Tau22 mice subjected to TUNEL assay and co-labeled with AT100 **(a)** or AT8 **(b)** and analyzed by laser scanning confocal microscopy. Nuclei were detected using DAPI staining. Cells exhibiting cytoplasmic aggregated (AT100) and/or hyperphosphorylated (AT8) Tau did not show any TUNEL-positive staining after HS (white arrowhead) or 24 h after HS. **(c)** Representative images of human brain sections from an AD patient (Braak 6) subjected to TUNEL assay and co-labeled with AT8 and analyzed by confocal microscopy. Nuclei were detected with DAPI staining. Lower magnification revealed a TUNEL-negative neuron exhibiting hyperphosphorylated Tau. Higher magnification revealed a TUNEL-positive neuron demonstrating moderate pathological Tau phosphorylation. Nucleic acid damage was related to early, but not late, stages of Tau phosphorylation. **(d)** Representative images of sagittal CA1 sections from 7m THY-Tau22 mice subjected to TUNEL assay and co-stained with 8OHdG antibody and analyzed by laser scanning confocal microscopy. Nuclei were detected using DAPI staining. Neither TUNEL-positive staining nor 8OHdG labeling were observed under C, HS or HS+24H conditions, indicating a lack of stress-induced nucleic acid damage in the late stages of Tau pathology. *Scale bars* indicate 20 μm .

Fig S4 3D imaging of prefibrillar oligomers in the early stages of Tau pathology. **(a)** Stacked sequential z-axis images of TOC1 immunoreactivity and DAPI staining in sagittal CA1 sections from 5m THY-Tau22 mice under C, HS and HS+24H conditions. **(b)** Representative magnification of CA1 nuclei under the C, HS and HS+24H conditions. Width: 85 μm ; Height: 85 μm ; Depth: 5.9 μm . **(c)** 3D imaging of prefibrillar oligomers in WT CA1 cells. Stacked sequential z-axis images of TOC1 immunoreactivity and DAPI staining in sagittal CA1 sections from 7m WT mice under C, HS and HS+24H conditions.

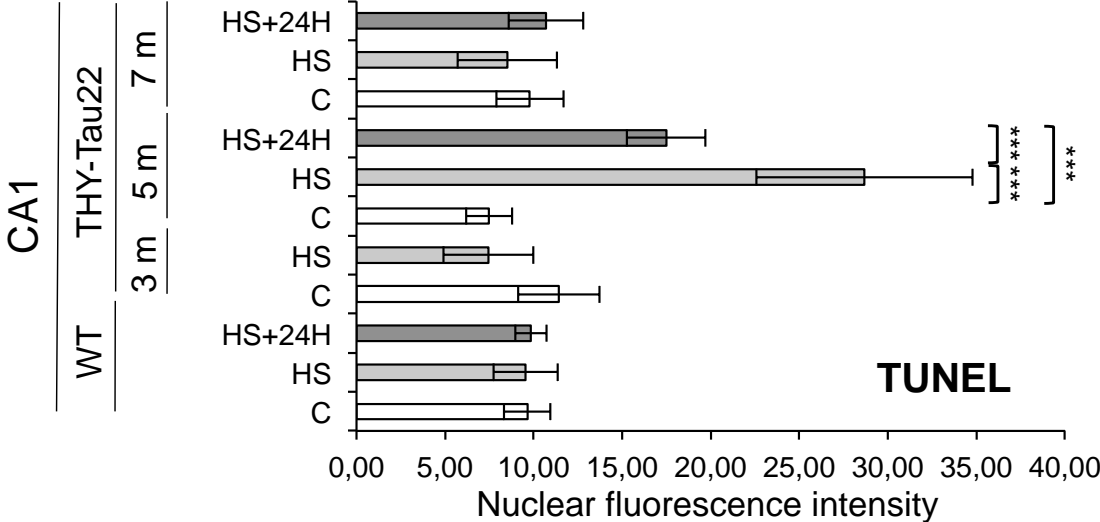
Fig. S5 HS increases Tau misfolding and Tau oligomerization in the whole cell body

HS-induced effect on nuclear and cytoplasmic Tau pathology. The effect of HS on Tau pathology in the entire CA1 was detected by labeling with phospho-dependent (AT8, PT212), conformational-dependent (MC1: early misfolded Tau), insoluble fibrillar Tau (AT100), small oligomer (TOC1, T22) antibodies under control (C), HS or 24 h after HS (HS+24H) conditions, and analyzed by confocal microscopy. The level of

gray (0 = black; 255 = white) was quantified within the whole CA1 subfield from 5m THY-Tau22 mice. HS led to slightly increased pathological phosphorylation and promoted Tau oligomerization. Later responses to HS (HS+24H) dramatically potentiated MC1 misfolding and Tau oligomerization in the entire cell body. HS had no effect on Tau fibrillization (AT100). The data are shown as the means \pm S.D. of 20 to 30 nuclei. ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$.

Fig. 1

a



b

5m THY-Tau22 CA1

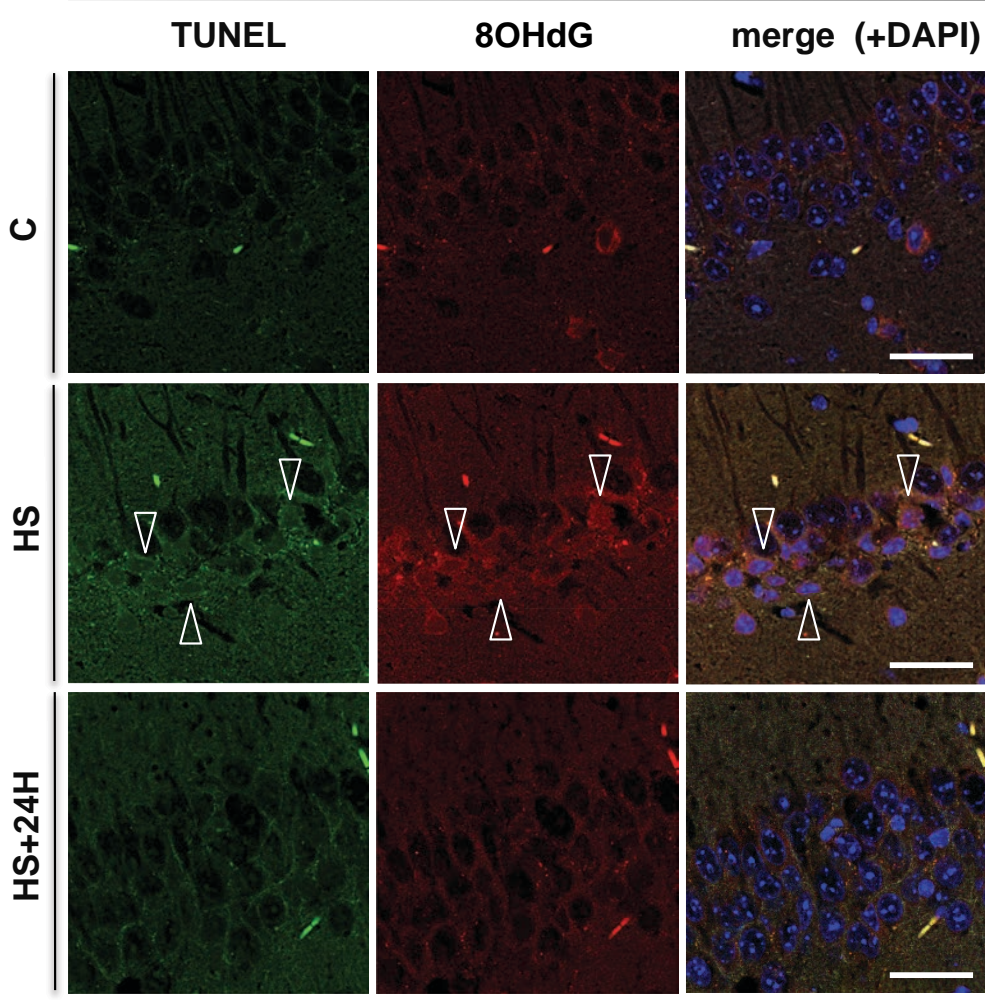
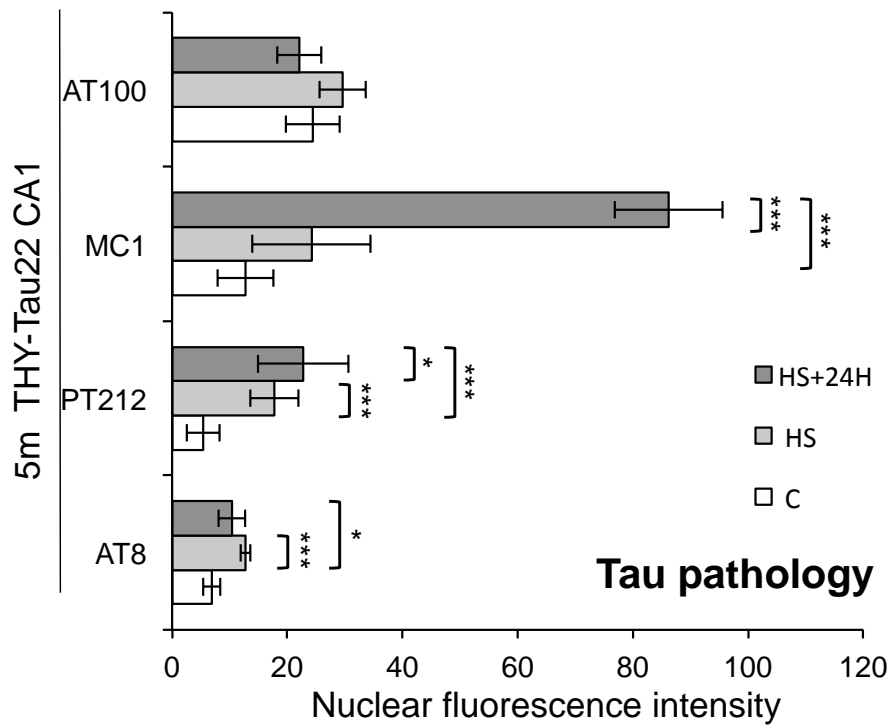
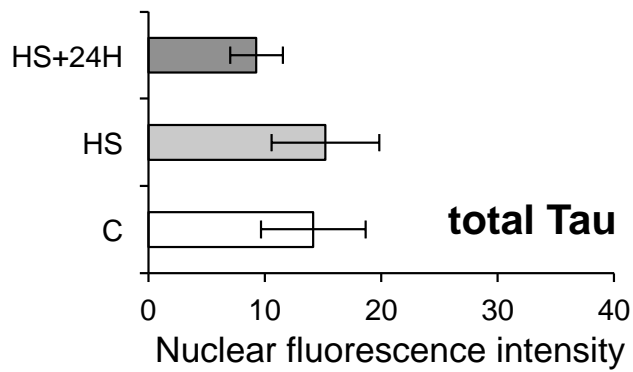


Fig.2

a



b



c

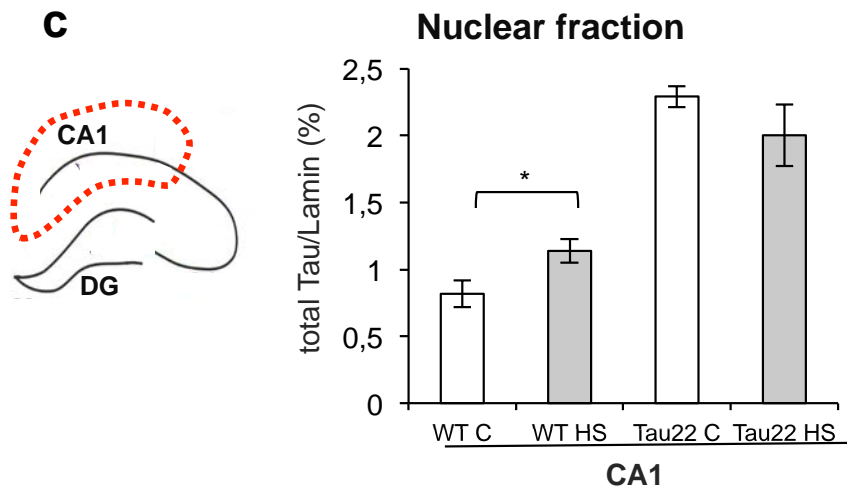
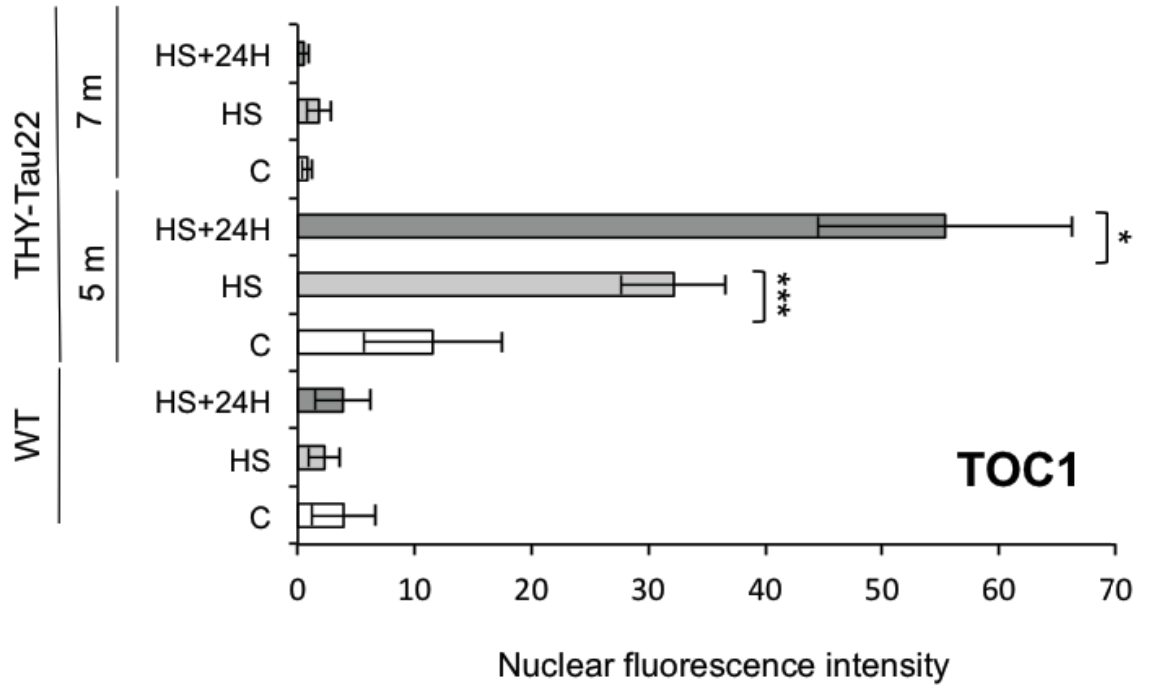


Fig. 3

a



b

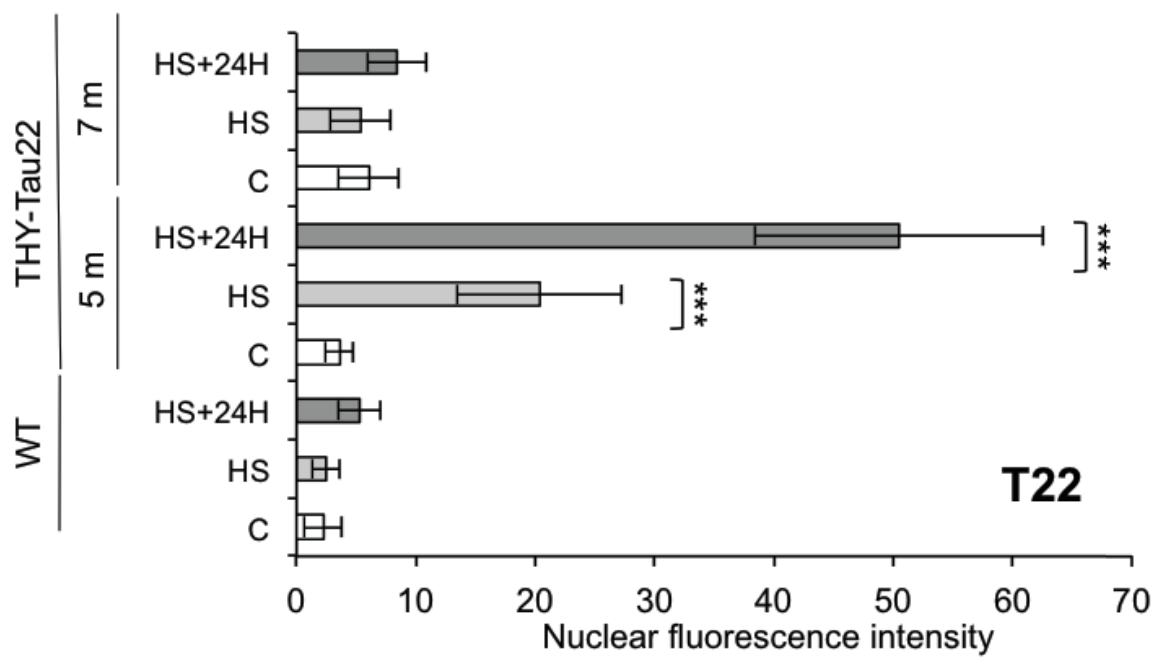


Fig. 4

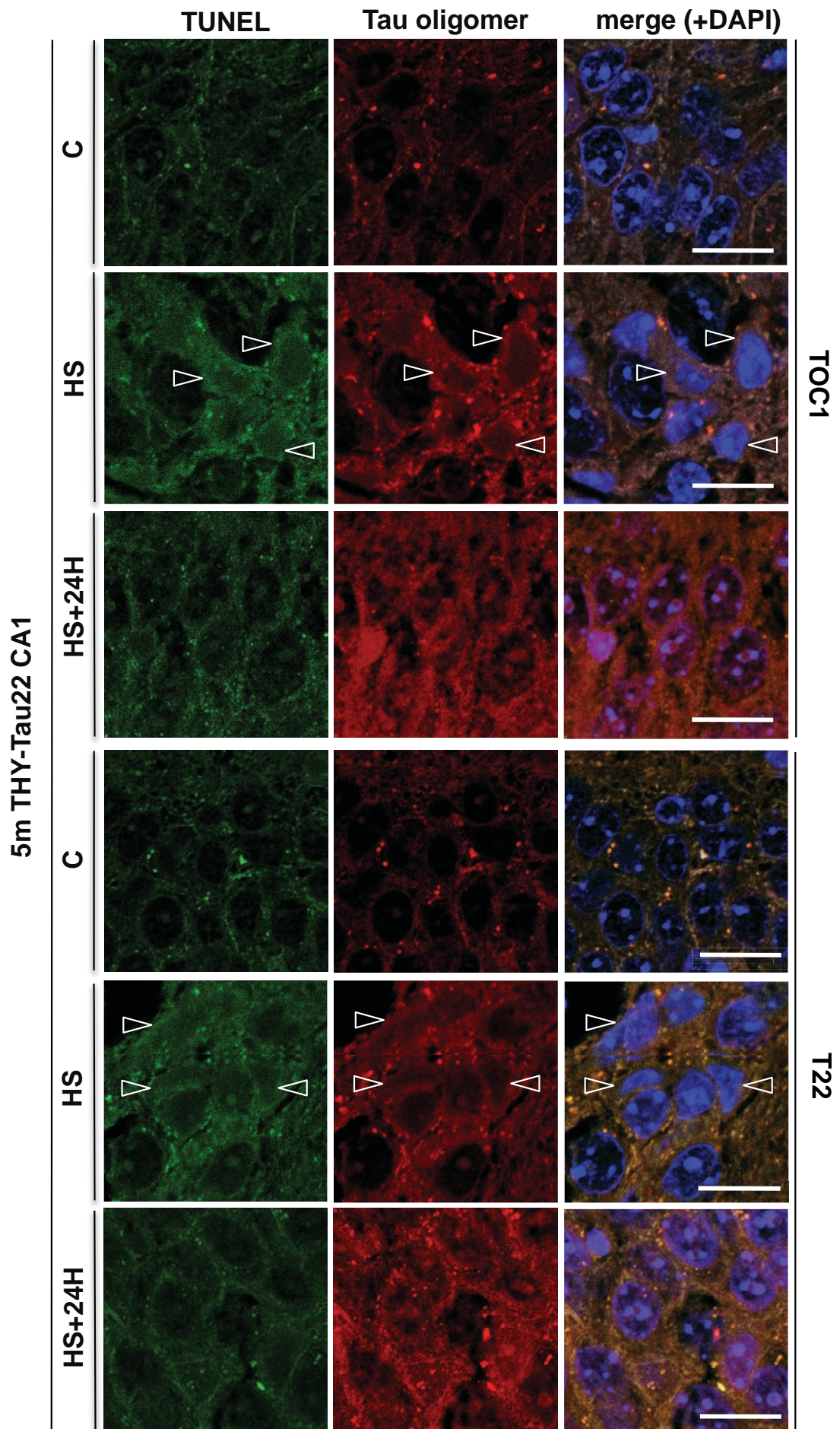


Fig. 5

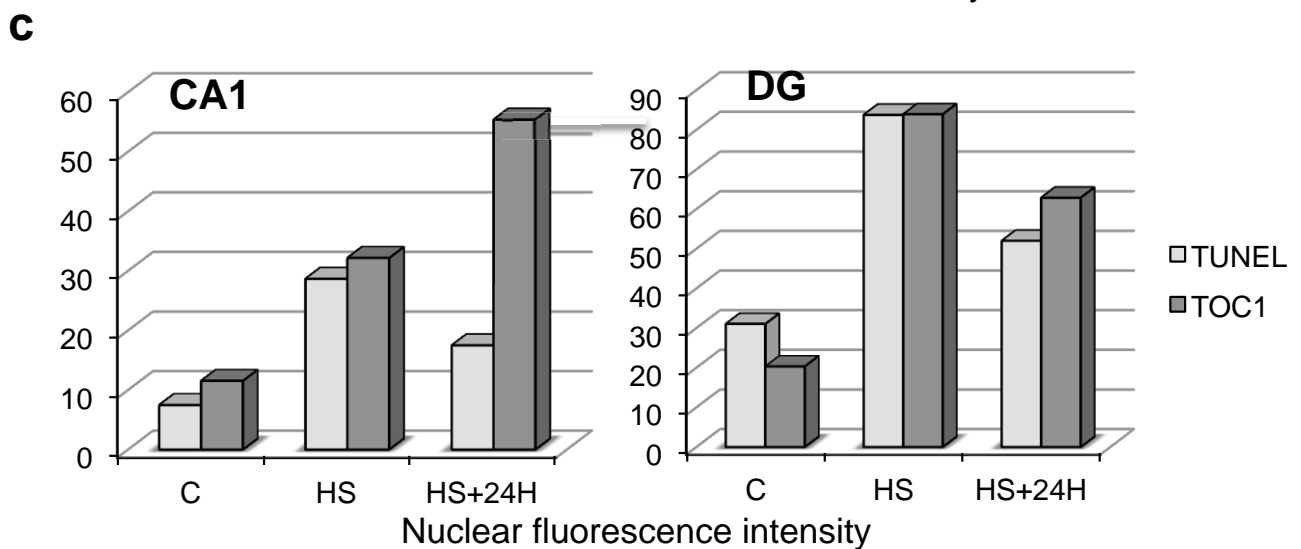
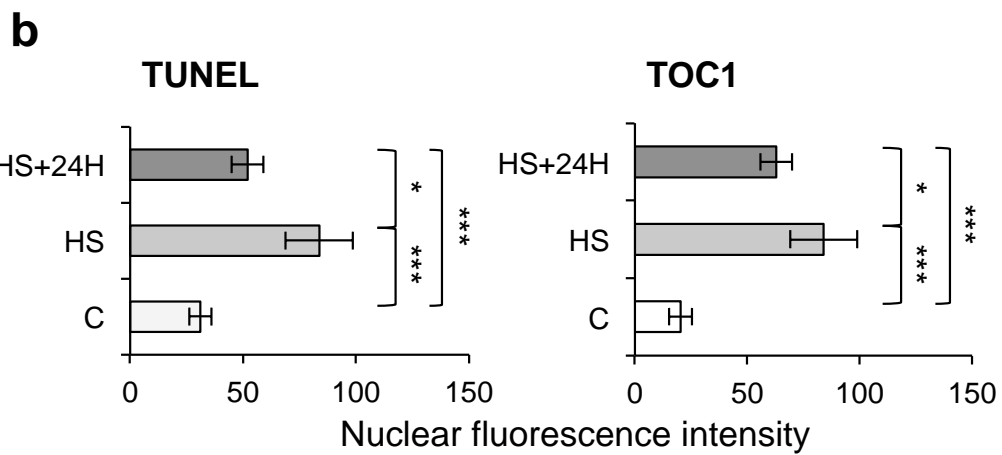
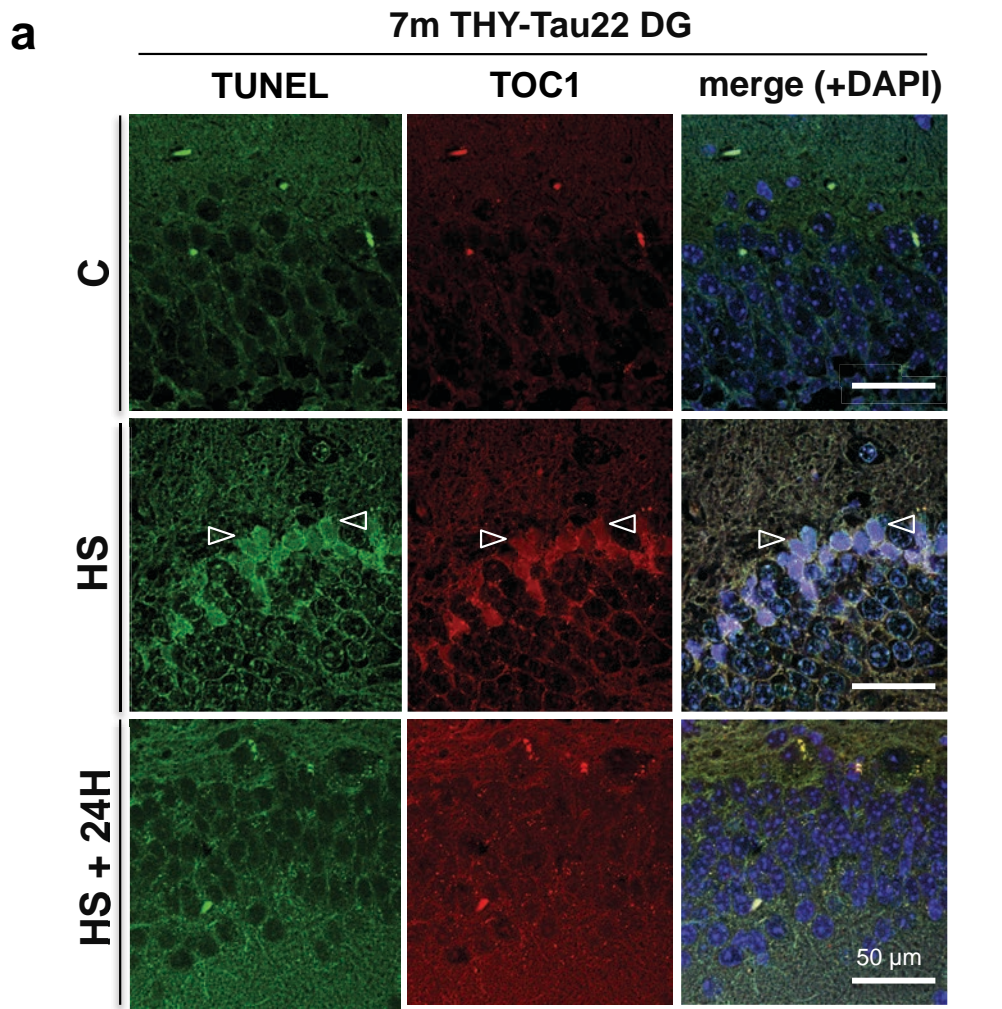


Fig. 6

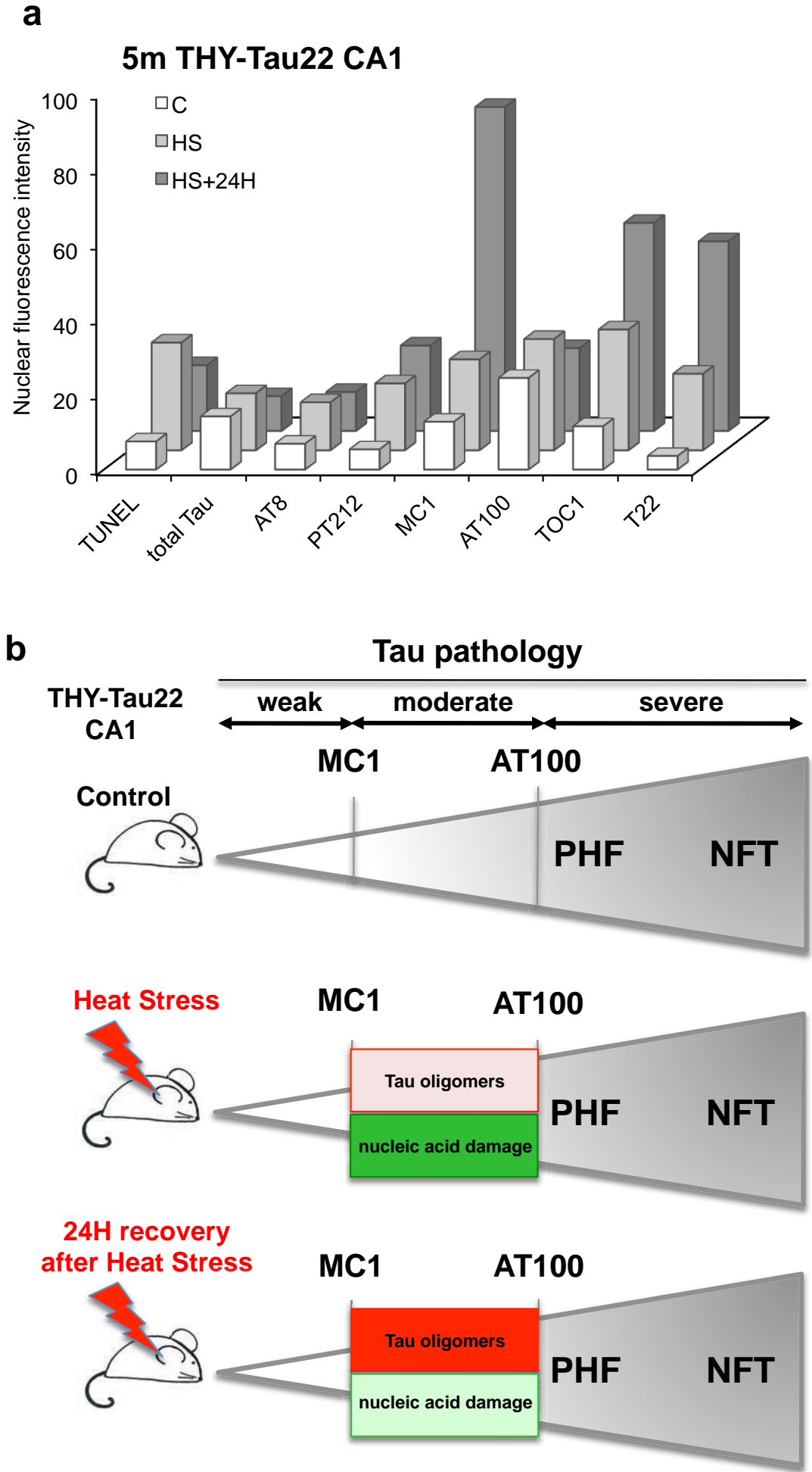


Fig S1

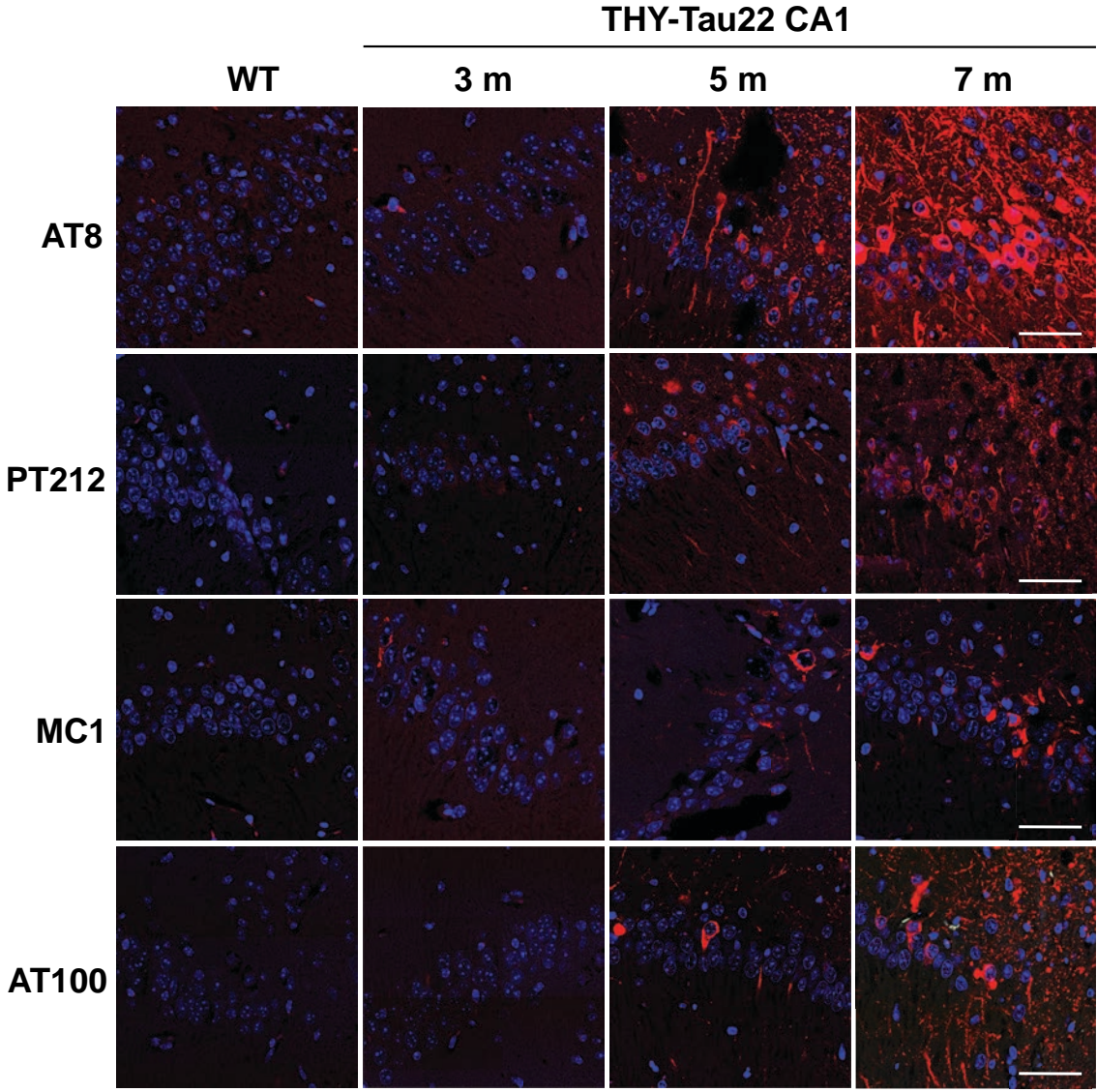


Fig S2

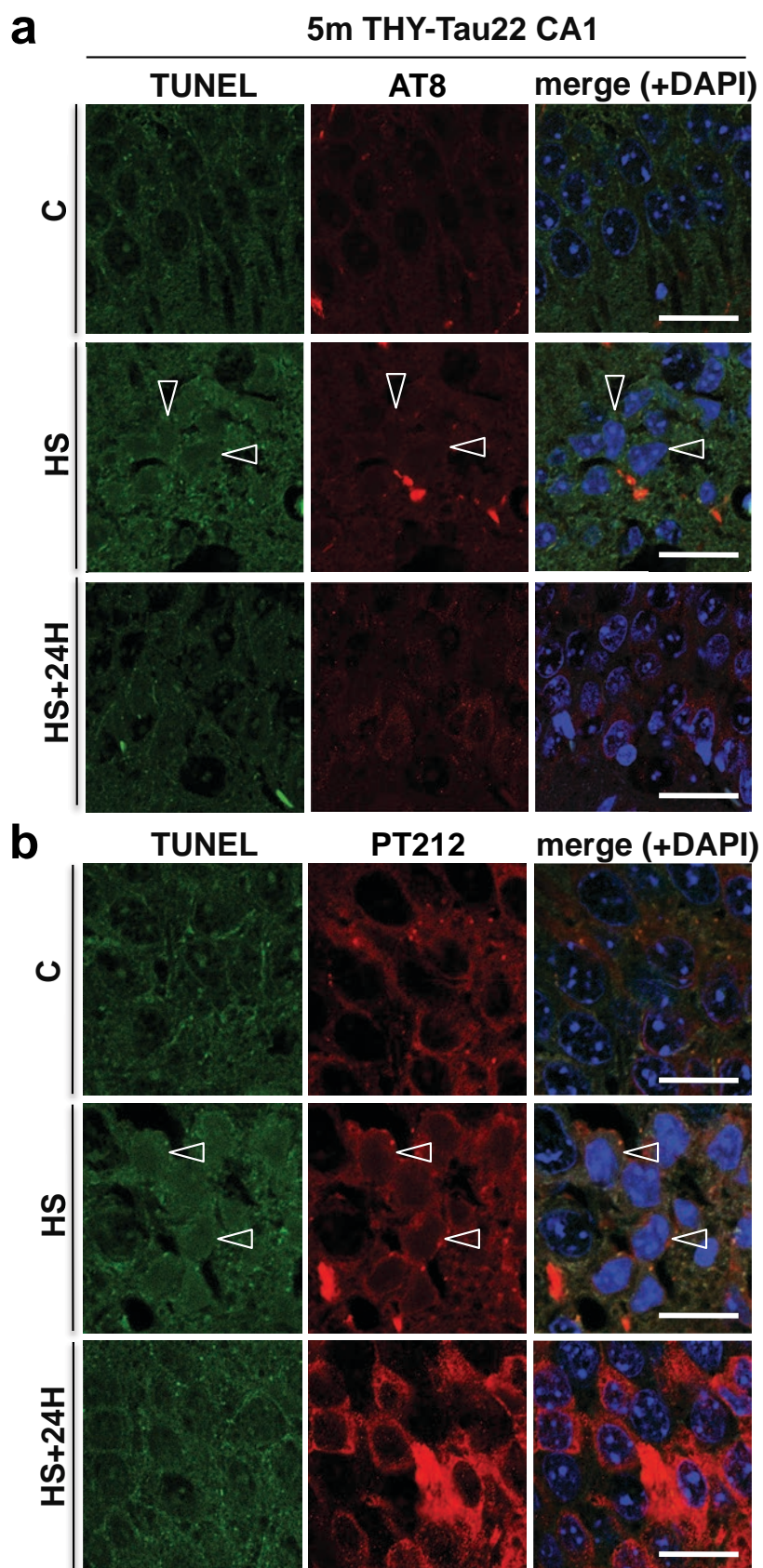


Fig S2cde

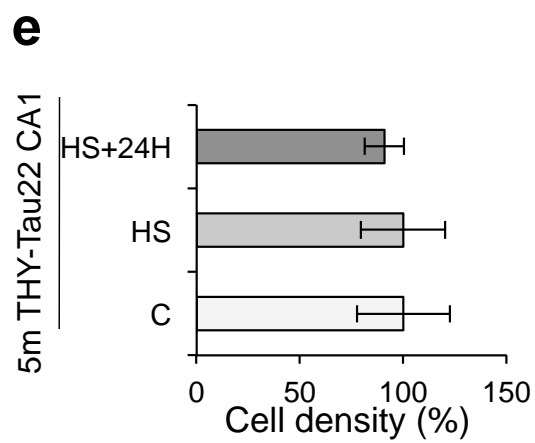
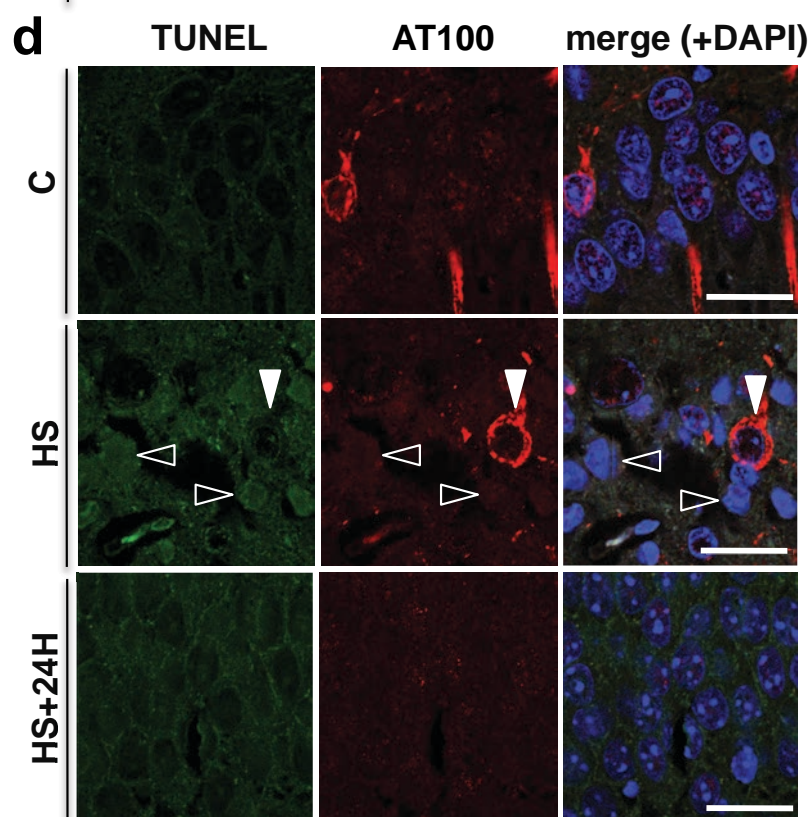
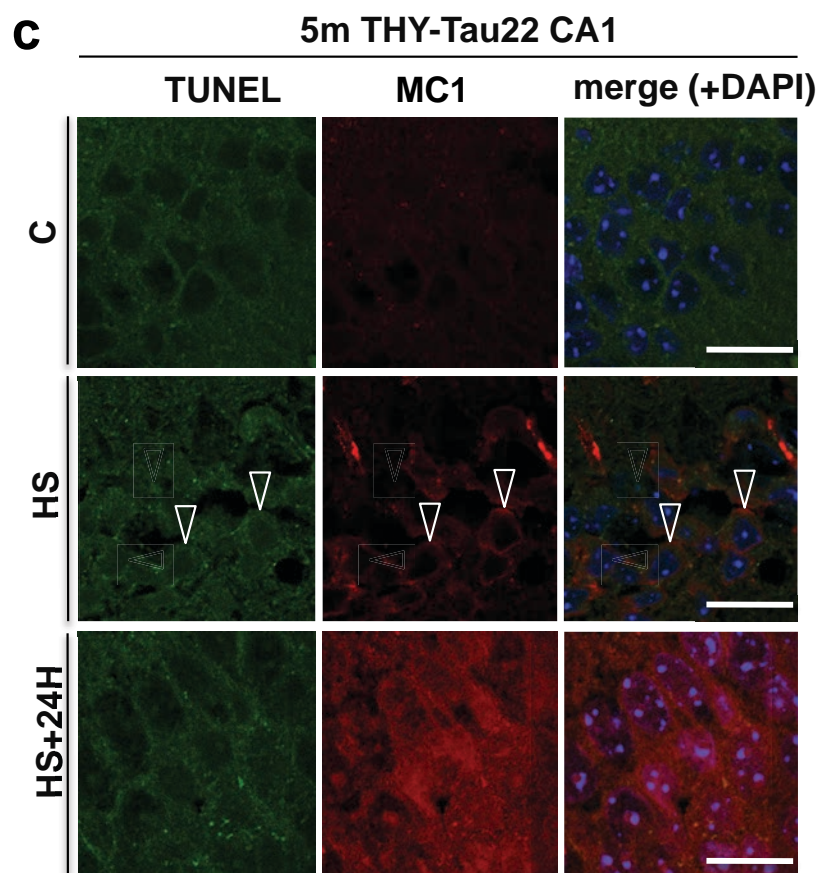


Fig S3ab

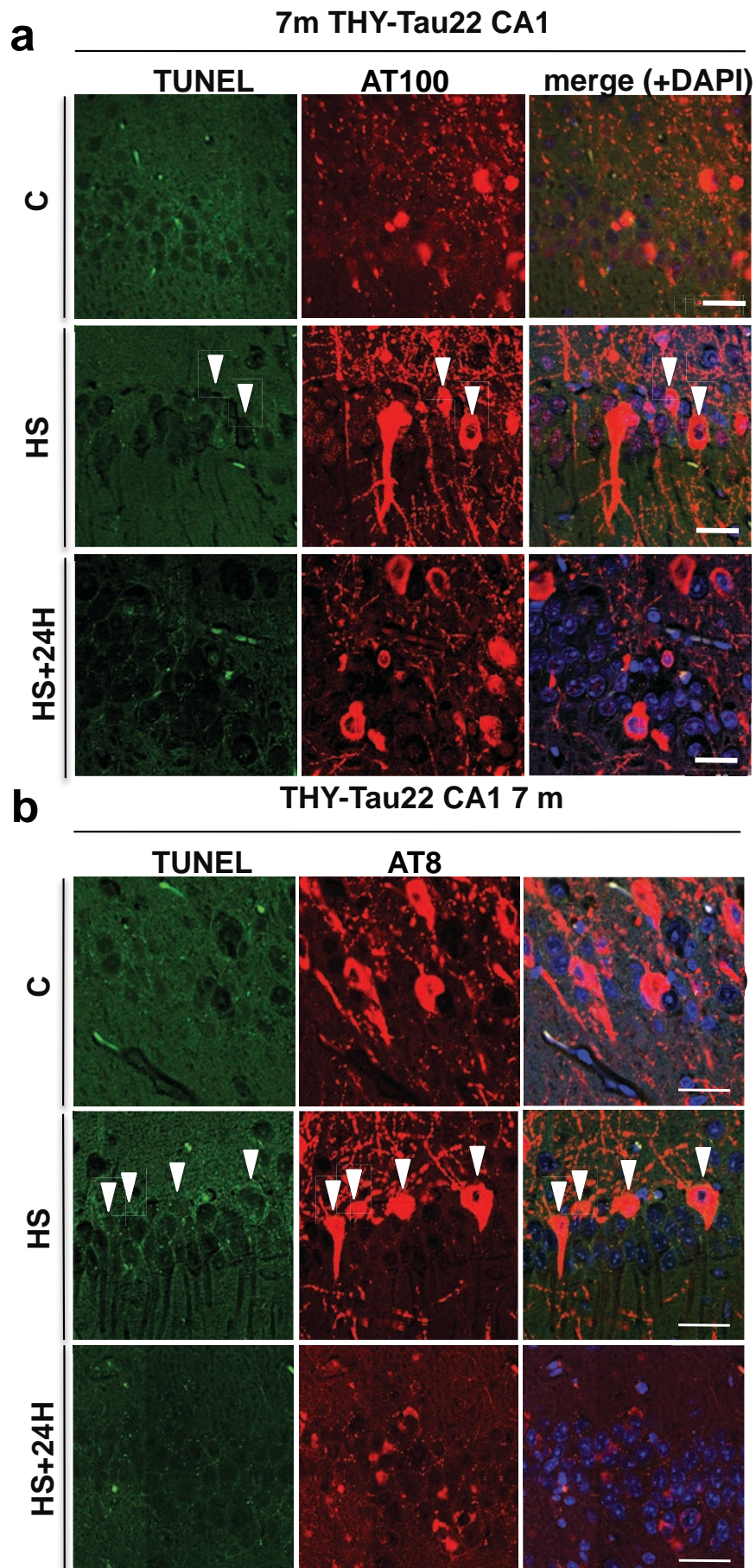


Fig S3cd

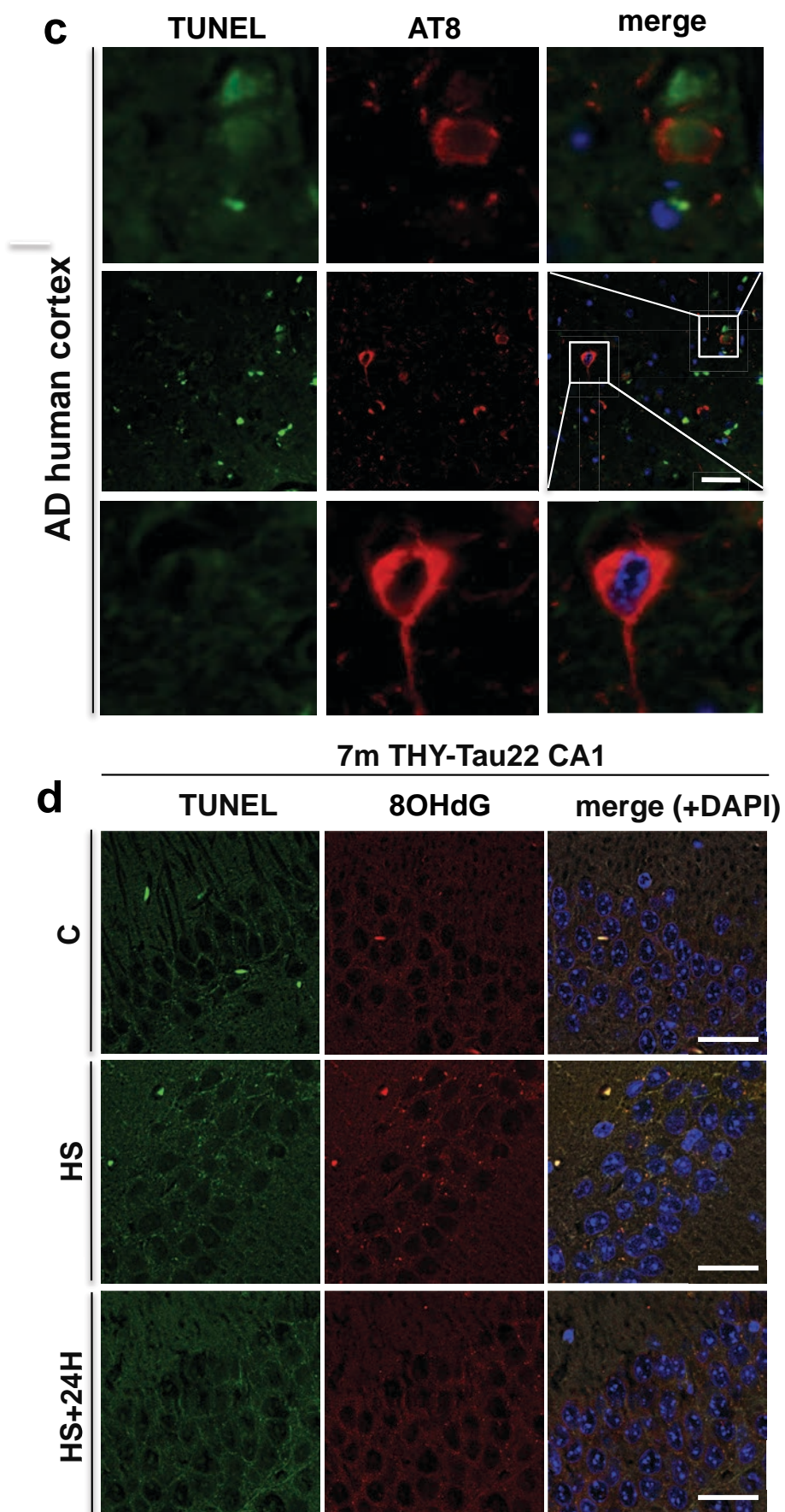


Fig 4ab

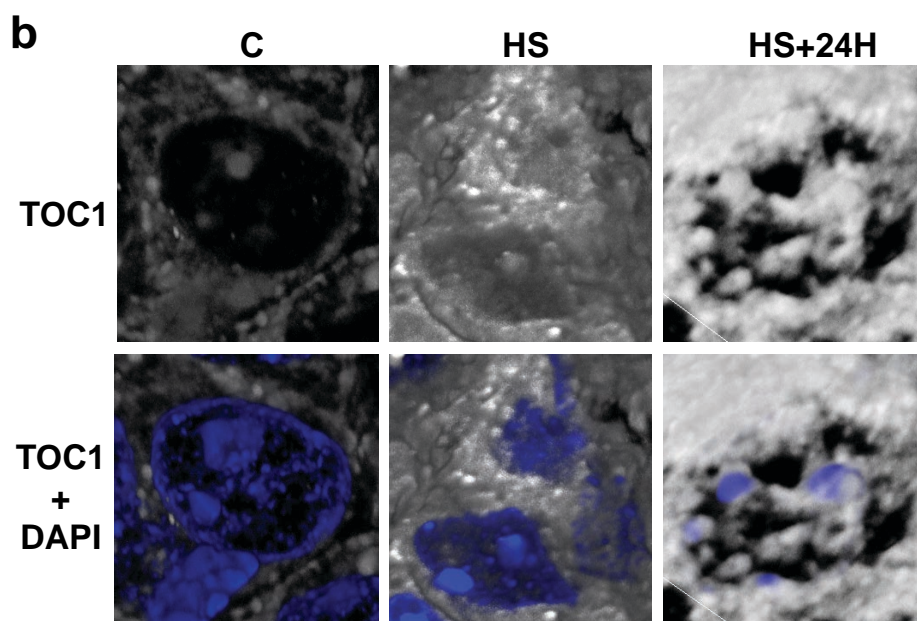
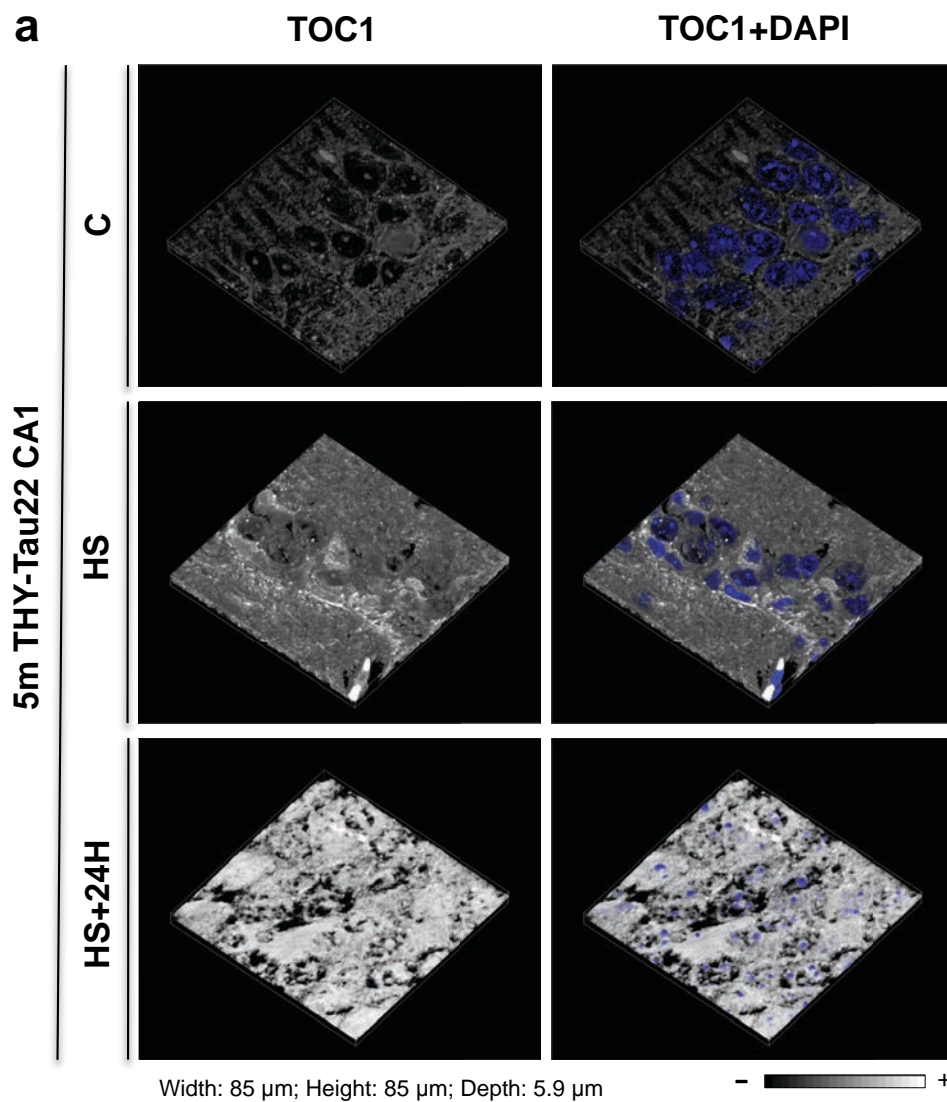


Fig S4c

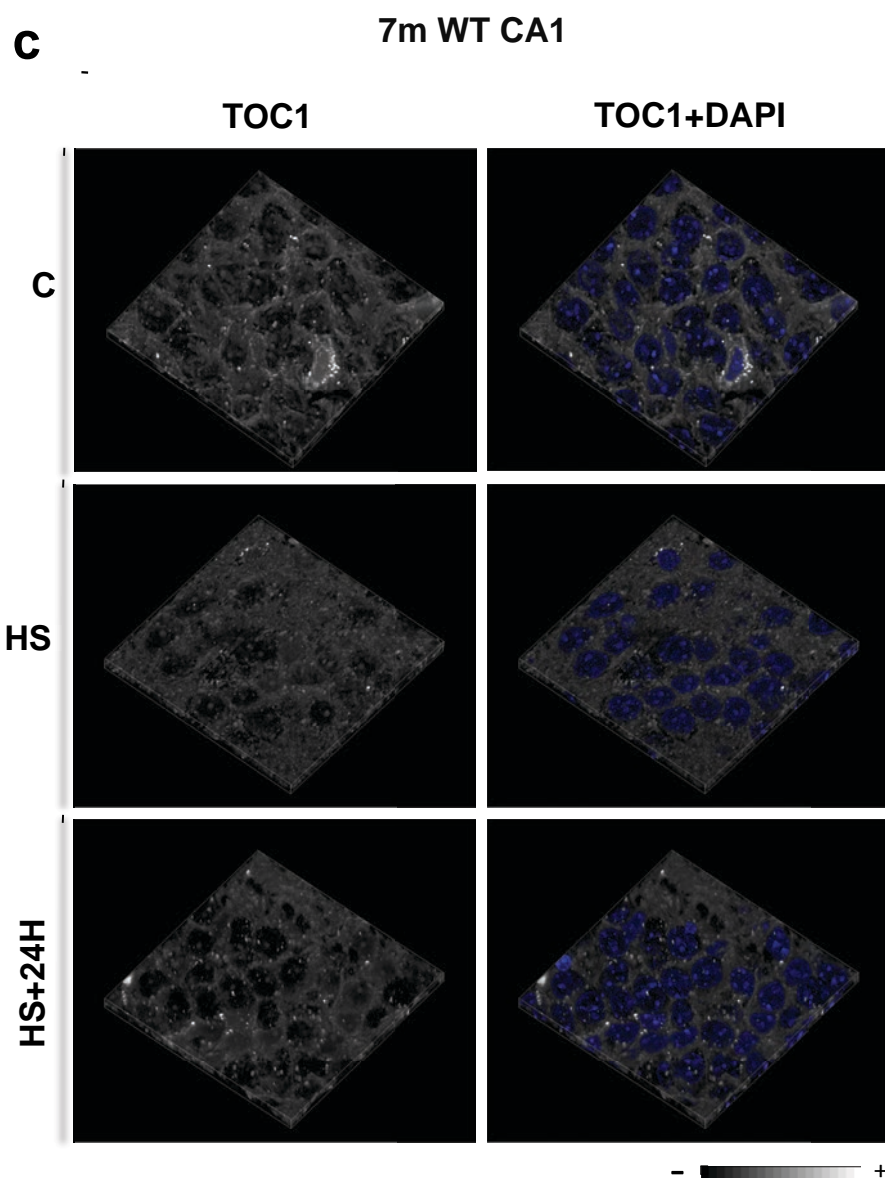
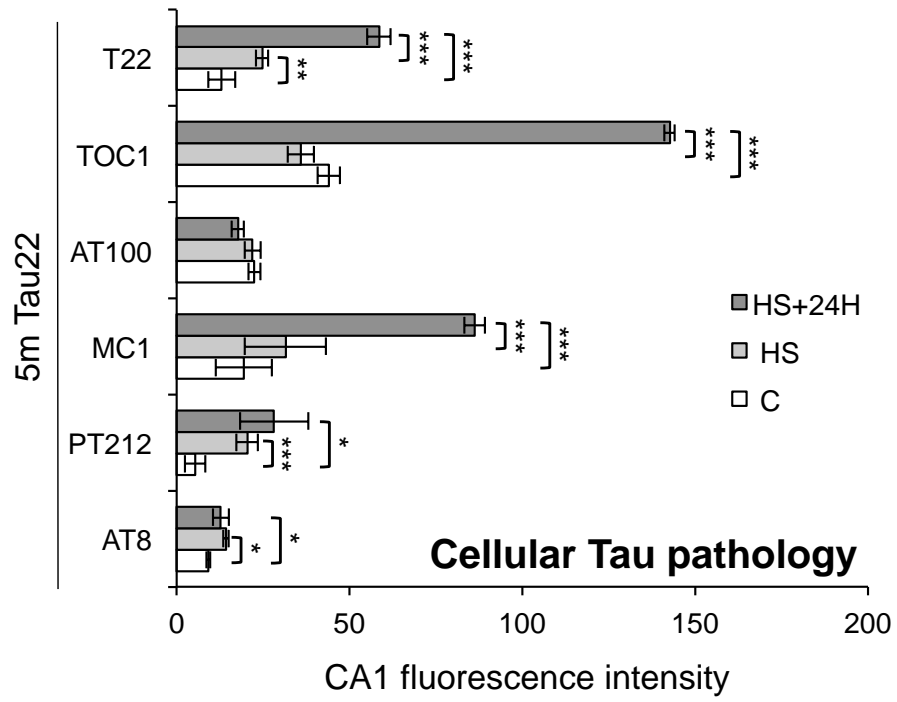


Fig. S5



I.2.1/ EFFET D'UN STRESS HYPERTHERMIQUE SUR L'INTÉGRITÉ DES ACIDES NUCLÉIQUES CHEZ DES SOURIS SAUVAGES

En complément des résultats décrits dans cette publication, nous décrivons également les effets d'un stress hyperthermique obtenus chez les souris sauvages. Ces souris sont âgées de 7 mois, l'âge le plus élevé des souris THY-Tau22 étudiées. Ainsi, nous observerons les dommages à l'ADN induits avec le temps chez les souris à 7 mois ainsi que les dommages dus au stress hyperthermique. Cela nous servira de contrôle positif pour les résultats obtenus chez les souris THY-Tau22.

Les souris sauvages ont donc été soumises ou non à un stress hyperthermique. Puis l'intégrité des acides nucléiques a été étudiée par TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transférase dUTP nick end labelling assay) dans le noyau des neurones hippocampiques. Aucune augmentation significative du marquage TUNEL nucléaire n'a été observé dans la CA1 des souris sauvages après un stress hyperthermique (Figures n°22, 23, et 24). Cela indique qu'un stress hyperthermique n'induit pas de coupures des acides nucléiques des neurones de la CA1 des souris sauvages.

L'influence d'un stress hyperthermique sur l'état de phosphorylation de Tau chez les souris sauvages a été étudiée par immunofluorescence à l'aide d'anticorps spécifiques reconnaissant différents épitopes phosphorylés de Tau. Aucun changement dans le marquage à l'aide des anticorps AT8 (PS202 et S205 de Tau) et PT212 n'a été observé chez ces souris après un stress hyperthermique (Figure n°22 et 23). Le stress hyperthermique n'induit pas de modification de l'état de phosphorylation de la protéine Tau murine chez les souris sauvages, au moins sur les épitopes étudiés.

L'oligomérisation de Tau a également été étudiée par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps TOC 1. Aucune augmentation du marquage à l'aide de cet anticorps n'a été détectée chez les souris sauvages soumises à un stress hyperthermique (Figure n°24). Le stress hyperthermique n'entraîne pas de modification de la conformation de la Tau murine chez les souris sauvages.

24 heures après l'induction d'un stress hyperthermique, aucun marquage n'a été observé à l'aide des différents anticorps utilisés. Aucune modification de l'état de

phosphorylation ou de la conformation de Tau n'est détectée une journée après le stress hyperthermique.

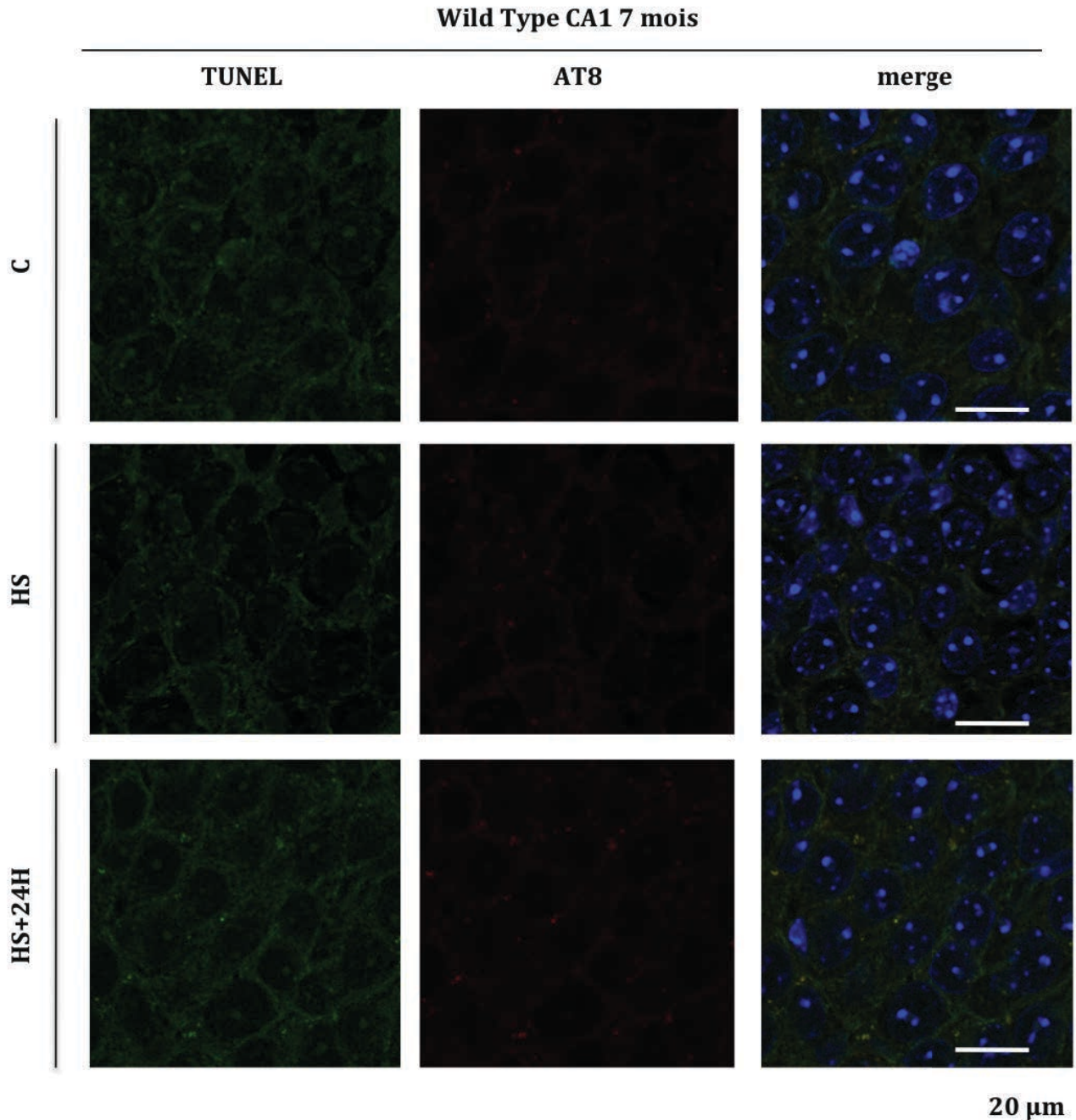


Figure 23 : Immunohistochimie dans la CA 1 de souris sauvages âgées de 7 mois. Les souris ont été soumises ou non à un stress hyperthermique. Analyse en conditions contrôle, de stress hyperthermique (HS) et 24 heures après le stress (HS + 24h) par immunofluorescence et microscopie confocale à l'aide de l'anticorps AT8 de Tau (PSer 202 et 205 de Tau) et TUNEL assay.

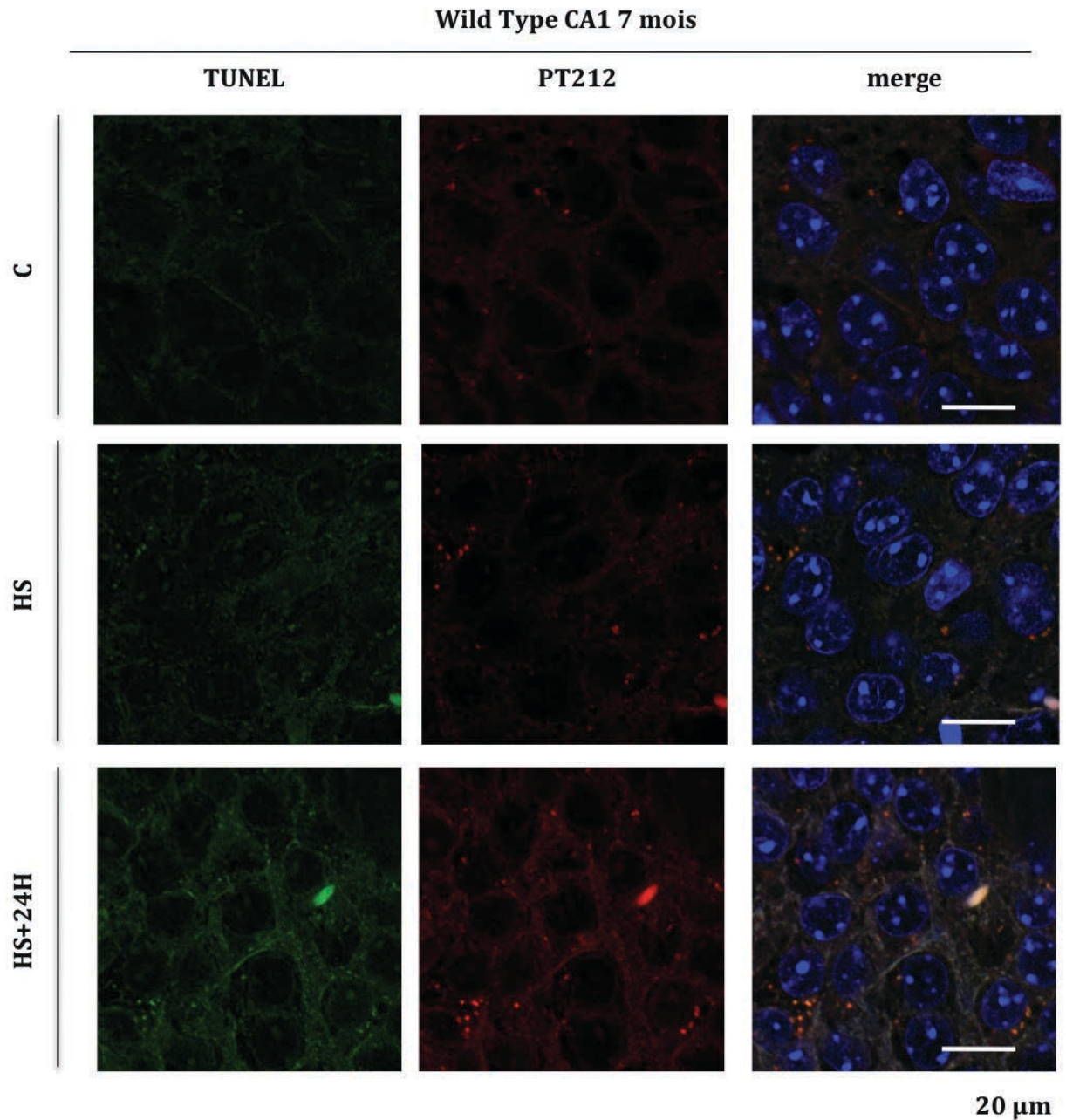


Figure 24 : Immunohistochimie dans la CA 1 de souris sauvages âgées de 7 mois. Les souris ont été soumises ou non à un stress hyperthermique. Analyse en conditions contrôle, de stress hyperthermique (HS) et 24 heures après le stress (HS + 24h) par immunofluorescence et microscopie confocale à l'aide de l'anticorps PT212 de Tau et TUNEL assay.

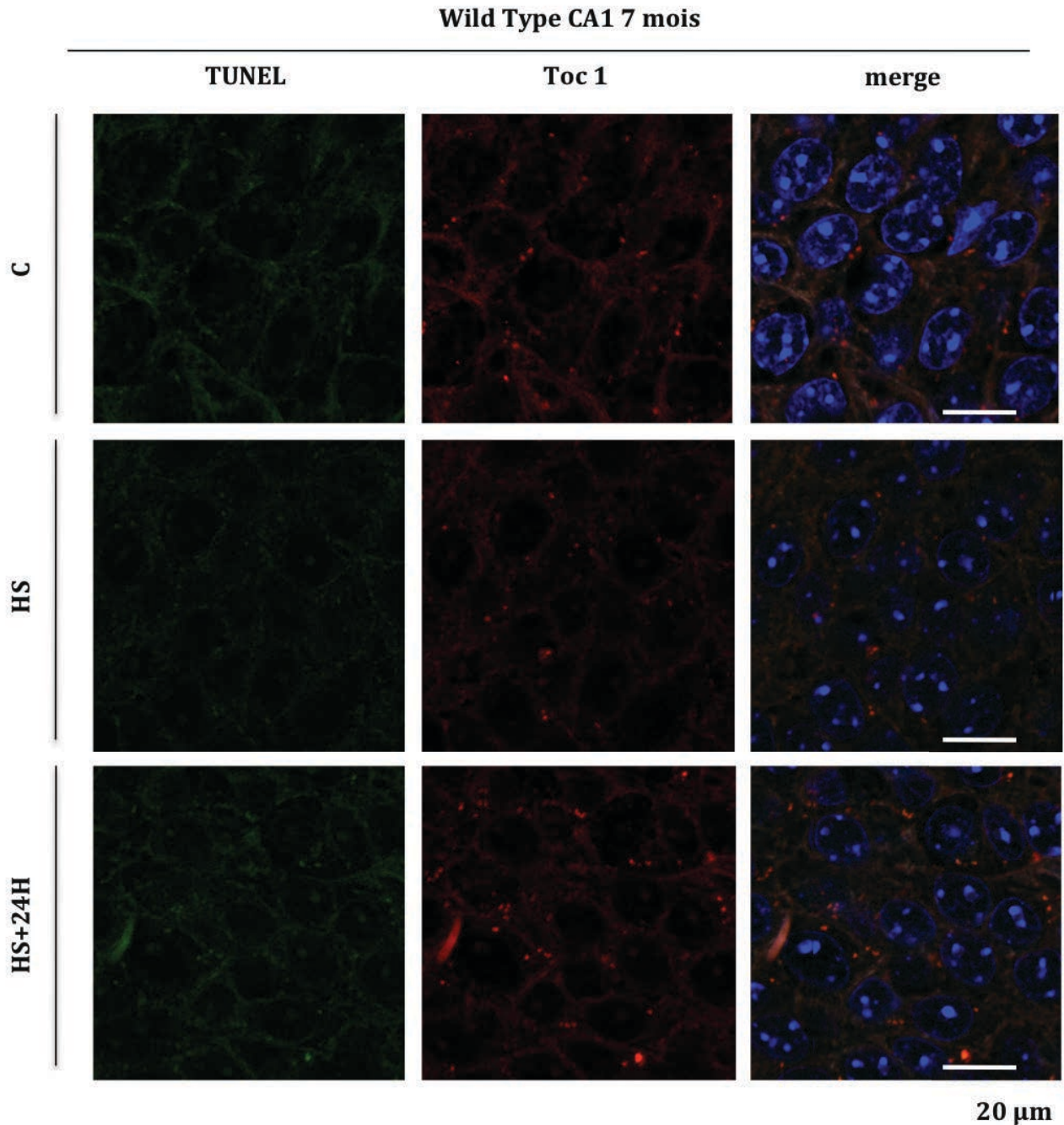


Figure 25 : Immunohistochimie dans la CA 1 de souris sauvages âgées de 7 mois. Les souris ont été soumises ou non à un stress hyperthermique Analyse en conditions contrôlé, de stress hyperthermique (HS) et 24 heures après le stress (HS + 24h) par immunofluorescence et microscopie confocale à l'aide de l'anticorps TOC1 de Tau et TUNEL assay. L'anticorps TOC1 reconnaît la protéine Tau lorsqu'elle est oligomérisée.

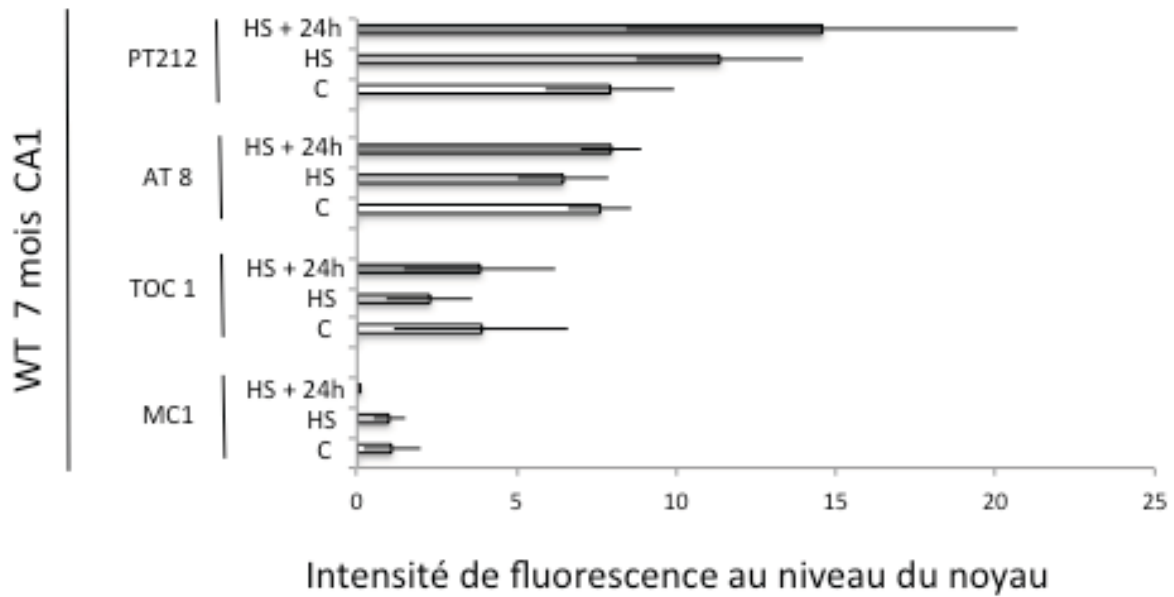


Figure 26 : Effet d'un stress hyperthermique sur la protein Tau nucléaire de souris sauvages âgées de 7 mois. L'effet du stress sur Tau dans les noyaux de la CA1 a été détecté par un marquage avec des anticorps phospho-dépendant (AT8, PT212), conformationnels (MC1) de Tau et reconnaissant les petits oligomères (TOC1) dans les conditions contrôle (C), de stress (HS) ou 24 h après HS (HS + 24 h). Les résultats ont été analysés par microscopie confocale. Le niveau de gris (0 = noir, 255 = blanc) a été quantifiée dans les noyaux de la CA1 de souris sauvages de 7 mois.

III/ CARACTÉRISATION DE L'ETAT DE PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE TAU ASSOCIÉE AUX RADEAUX LIPIDIQUES EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE

III.1/ OBJECTIFS

La membrane plasmique des cellules est notamment constituée de microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides nommés radeaux lipidiques. Ces microdomaines spécialisés de la membrane constituent des points d'ancrage essentiels pour l'assemblage de molécules de signalisation, influencent la fluidité de la membrane et le trafic des protéines membranaires et régule la neurotransmission. Ils jouent aussi un rôle important dans l'étiologie de nombreuses maladies neurodégénératives (Schengrund, 2010).

De façon intéressante, il a été décrit que Tau est capable d'interagir avec la membrane plasmique neuronale (Brandt et al., 1995) notamment au niveau des radeaux lipidiques. Cependant, l'état de phosphorylation de Tau associée aux radeaux lipidiques reste à ce jour inconnu mis à part la présence de la phosphorylation des serines 396 et 404 dans le cortex de cerveaux de patients Alzheimer (Kawarabayashi *et al*, 2004). C'est pourquoi nous avons voulu caractériser l'état de phosphorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques en conditions physiologique et pathologique.

II.2/ MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.2.1/ ISOLATION DES RADEAUX LIPIDIQUES

Le protocole consiste à isoler les radeaux lipidiques, qui sont des micro-domaines de la membrane plasmique insoluble par fractionnement sur gradient de sucrose à partir de

régions de cerveaux de souris (hippocampe, cortex). Pour ce faire, le tissu cérébral dont nous souhaitons isoler les radeaux lipidiques est homogénéisé et passé plusieurs fois dans une seringue. Cet homogénat est centrifugé pendant 10 minutes à 1000 g (afin de séparer les fractions triton soluble et insoluble) et le surnageant est récupéré puis mélangé avec du sucrose 80% afin d'avoir une concentration finale de 40 % de sucrose. Cette préparation est placée dans un tube à ultracentrifugation et un gradient de concentration de sucrose est ensuite réalisé (40 % - 30 % - 5 % de sucrose). Nous réalisons ensuite une ultracentrifugation à 100000 g pendant 18 heures et à 4°C puis, différentes fractions d'un millilitre sont récupérées à l'aide d'une pipette.

Les protéines de chaque fraction sont précipitées à l'aide de TCA (acide trichloreacétique) et chaque fraction est ensuite solubilisée dans du tampon pour pouvoir être déposée sur un gel. Après immunoempreinte, les fractions contenant les radeaux lipidiques sont identifiées à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre la flotilline qui est un marqueur des radeaux lipidiques. Il pourra remarquer que les radeaux lipidiques étant « légers » seront retrouvés dans les premières fractions collectées.

III.2.1/ ANTICORPS UTILISÉS

Anticorps	Epitopes ciblés sur l'isoforme la plus longue de Tau
Tau C Ter	15 derniers acides aminés (phospho-indépendant)
Tau N Ter	Acides aminés en partie amino-terminale (phospho-indépendant)
Tau 1	Sérines 195, 198, 199, 202 déphosphorylées
12 E 8	Sérines 262-356 phosphorylées
AT 270	Thréonine 181 phosphorylée
AT 8	Sérine 202 et thréonine 205 phosphorylées

PT212	Thréonine 212 phosphorylée
AT 180	Thréonine 231 phosphorylée
AT 100	Conformation pathologique

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés afin de caractériser l'état de phosphorylation des radeaux lipidiques

III. 3/ RÉSULTATS

III.3.1/ CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT DE PHOPSHORYLATION DE TAU AU NIVEAU DES RADEAUX LIPIDIQUES DANS DU CORTEX DE SOURIS SAUVAGES

Nous avons purifié des fractions contenant des radeaux lipidiques à partir du cortex de souris sauvages et identifié l'état de phosphorylation de différents épitopes de Tau à l'aide d'anticorps spécifiques (Figure n°25).

Les fractions enrichies en radeaux lipidiques sont mise en évidence par la présence de flotilline. La totalité de la protéine Tau est détectée dans ces fractions riches en rafts à l'aide d'un anticorps qui reconnaît la partie carboxy-terminale de Tau. Dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques, nous détectons essentiellement la protéine Tau lorsqu'elle est déphosphorylée sur les épitopes compris entre les sérines 195 et 202 (anticorps Tau 1). Un léger marquage est détectable également avec l'anticorps 12 E 8, qui reconnaît Tau lorsqu'elle est phosphorylée sur les sérines 262 et 356. **Nous avons donc observé que la protéine Tau interagissant avec les radeaux lipidiques est majoritairement sous sa forme déphosphorylée dans le cortex de souris sauvages.**

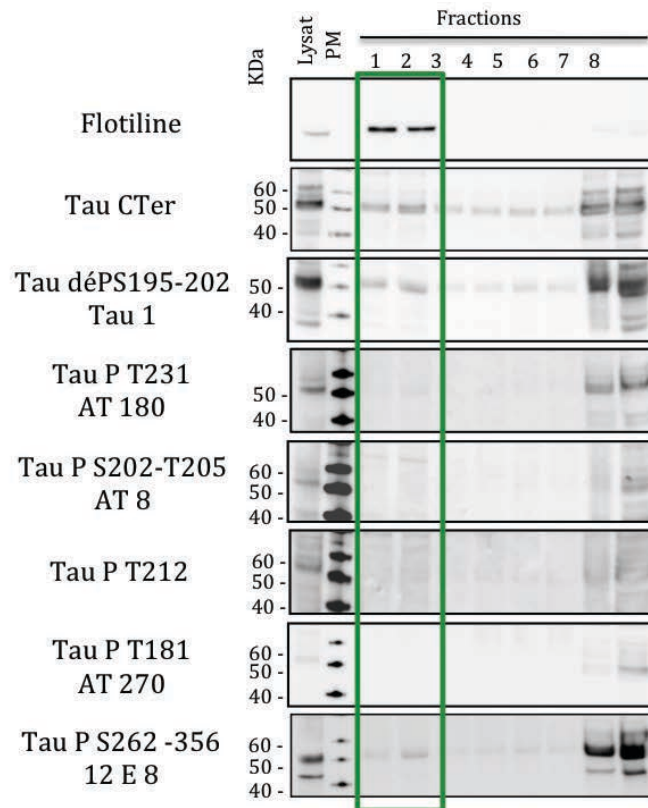


Figure 27 : Caractérisation de l'état de phosphorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques d'hippocampe de souris sauvages. Immunoempreinte réalisées à l'aide d'anticorps spécifiques de la protéine Tau après isolation des radeaux lipidiques. La flotilline sert de marqueurs des fractions contenant les radeaux lipidiques.

III.3.1/ CARACTÉRISATION DE L'ÉTAT DE PHOPSHORYLATION DE TAU AU NIVEAU DES RADEAUX LIPIDIQUES DANS DES CERVEAUX HUMAINS

L'association de Tau humaine au niveau des radeaux lipidiques a été étudiée dans les conditions physiologique et pathologique dans des cerveaux de sujets sains et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Des immunoempreintes à l'aide d'anticorps anti-Tau ont été réalisées. Ces anticorps sont phospho-dépendants, phospho-indépendants ou reconnaissent des conformations particulières de Tau. La flotilline étant un marqueur des radeaux lipidiques, elle nous permet ici d'identifier les fractions qui sont enrichies en radeaux lipidiques.

Dans le cerveaux des sujets sains, la protéine Tau est détectée dans les fractions contenant les radeaux lipidiques à l'aide des anticorps reconnaissant les parties carboxy- et amino-terminales. Cela indique que la protéine Tau serait associée aux radeaux lipidiques dans les conditions physiologiques dans le cortex humain. Tau n'est retrouvée que sous sa forme déphosphorylée sur les sérines comprises entre les résidus 195 et 202 de l'isoforme la plus longue de Tau dans les conditions physiologiques.

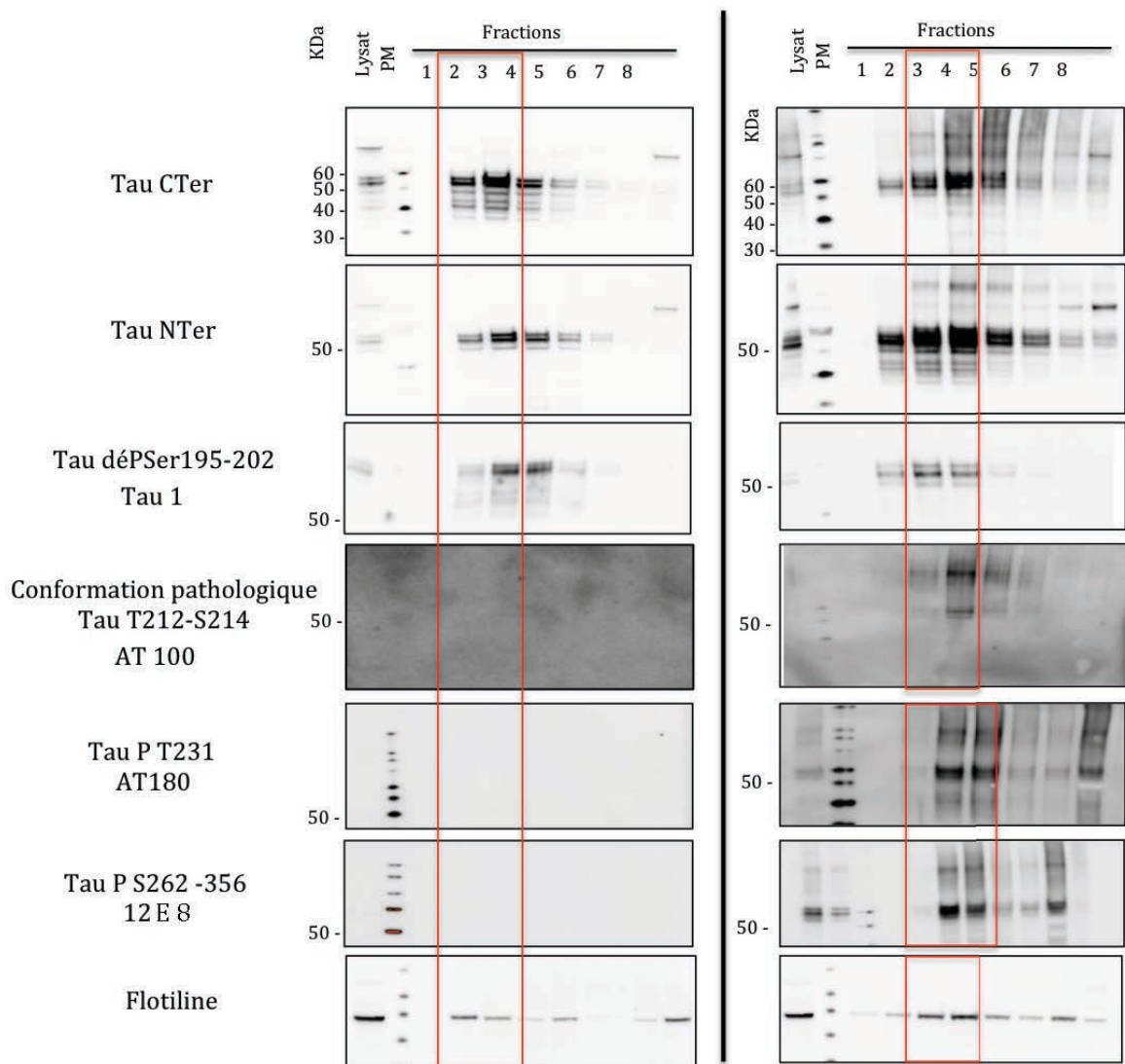


Figure 28 : Localisation de Tau dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques provenant de cerveaux de patients sains et de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les fractions ont été obtenues après centrifugation sur gradient de densité et analysées par immunoempreinte à l'aide d'anticorps phospho-dépendants et indépendants. Les fractions contenant de grandes quantités de flotilline (marqueur des radeaux lipidiques) sont encadrés en rouge.

Dans les cerveaux des patients atteints de la MA, Tau est également retrouvée dans les fractions enrichies en radeaux lipidiques. Cette protéine Tau est hyperphosphorylée puisqu'elle est détectée à l'aide de tous les anticorps reconnaissant la protéine Tau phosphorylée testés. Nous pouvons observer un marquage de Tau dans les hauts poids moléculaires avec tous les anticorps testés excepté l'anticorps Tau 1.

Tau se présente donc sous une forme oligomériques et agrégées au niveau des radeaux lipidiques des patients atteints de la MA.

DISCUSSION

DISCUSSION

Rôle de la protéine Tau nucléaire dans la protection de l'intégrité des acides nucléiques en condition physiologique et de stress hyperthermique

Rôle protecteur de Tau vis-à-vis de l'ADN en condition physiologique dans un modèle *in vivo*

L'accumulation de dommages à l'ADN génomique dans les neurones peut entraîner avec le temps un dysfonctionnement cérébral. La présence de dommages à l'ADN dans le cerveau de souris sauvages et déficientes en protéine Tau a été étudiée par Comet assay et TUNEL assay. Ces deux techniques ont permis de mettre en évidence qu'une déficience en Tau dans les neurones du cortex ou de l'hippocampe induit l'accumulation de dommages à l'ADN génomique en condition physiologique. Ces dommages correspondent notamment à de la fragmentation au niveau de la molécule d'ADN. Aucun dommage n'a été observé dans le cerveau des souris sauvages.

Dans les neurones déficients en Tau, nous observons donc la perte de sa fonction protectrice vis-à-vis de l'ADN. *In vivo*, Tau possède alors un rôle protecteur de l'ADN génomique comme observé précédemment dans des cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de souris. (Sultan *et al*, 2011).

Mise au point d'un nouveau modèle murin de stress hyperthermique transitoire

L'hyperthermie conduit à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) élevée. Par conséquent un stress hyperthermique peut être assimilé à un stress oxydant (Bruskov *et al*, 2002). Or, des dommages induits par le stress oxydant apparaît très tôt dans l'évolution de la MA (Migliore *et al*, 2005) (Wang *et al*, 2006). Afin d'étudier l'impact de l'augmentation du stress oxydant dans le cerveau sur l'intégrité de l'ADN, nous avons mis au point un modèle *in vivo* de stress hyperthermique.

Ce modèle est basé sur le modèle d'hyperthermie réalisé chez des rats publié par S.C. Papasozomenos (Papasozomenos and Su, 1991). Au laboratoire, nous avons soumis des souris à un protocole de stress hyperthermique. Après avoir été anesthésiées afin qu'elle ne thermo-régulent pas, les souris sont soumises à une température de 44°C pendant 20 minutes. Nous avons vérifié que le stress hyperthermique entraîne une augmentation de la quantité de produits du stress oxydant dans le cerveau des souris. Ainsi, nous avons observé la présence de protéines carbonylées.

Ces résultats montrent que ce modèle nous permet d'étudier l'impact du stress oxydant sur le fonctionnement neuronal. Il faut cependant rester conscient qu'un stress hyperthermique peut induire d'autres mécanismes que la production de ROS.

Différents modèles murins de stress oxydant ont d'ores et déjà été décrits dans la littérature. La majorité de ces modèles sont basés sur la suppression génétique d'enzymes de détoxification des ROS, tel que l'enzyme SOD. Cela engendre un stress chronique durant toute la vie de la souris. Le modèle de stress hyperthermique que nous avons mis au point à l'avantage d'être un stress aigu transitoire qui permet d'observer l'effet de la production de ROS de façon ponctuelle. De plus, ce stress peut être induit dans n'importe quelle lignée murine, sauvage ou transgénique.

Translocation nucléaire de la protéine Tau sous l'effet d'un stress hyperthermique

L'hyperthermie désigne une température corporelle supérieure à la normale. En réponse à un choc thermique, l'organisme produit de manière rapide et transitoire des protéines spécifiques. Ces protéines sont nommées « protéines de choc thermique » (ou HSP pour Heat Shock Protein). Elles sont hautement conservées entre les espèces (Hunt and Morimoto, 1985) et possèdent un rôle de chaperonne permettant la protection de l'intégrité de protéines. D'autres phénomènes que le stress hyperthermique peuvent induire la synthèse des HSP. C'est le cas de stress chimiques, comme l'exposition à l'arsenic (Del Razo *et al.*, 2001) ou de stress physiques, comme l'anoxie (Fei *et al.*, 2007). Ainsi l'expression de protéines HSP se produirait lors d'un état général de stress physiologique.

Nous avons montré au cours de notre étude qu'un stress hyperthermique, entraîne l'accumulation nucléaire de la protéine Tau chez des souris sauvages. Ceci suggère que

Tau transloquerait du compartiment cytoplasmique vers le compartiment nucléaire en condition de stress hyperthermique.

Pour passer à travers l'enveloppe nucléaire, les protéines doivent emprunter les différents pores nucléaires localisés dans la membrane. Les protéines d'un poids moléculaire inférieures à environ 40 kDa diffusent de manière passive à travers les pores nucléaires. Pour les autres, leur mécanisme de transport est sélectif. Le passage des protéines de hauts poids moléculaire à travers le pore nécessite des signaux spécifiques induits par la présence de séquences particulière au sein des protéines. Les séquences NLS (Nuclear Localisation Signal) permettent le transport cytoplasme-noyau et les séquences NES (Nuclear Exportation Signal) permettent le transport noyau-cytoplasme. La protéine Tau est une protéine qui possède un poids moléculaire d'environ 50 kDa. Elle ne peut donc pas diffuser librement à travers des pores nucléaires. Aucune séquence NLS canonique n'a été mise en évidence au sein de Tau. Son transport vers le noyau nécessite donc probablement que Tau se lie à une autre protéine qui possède une séquence NLS. Ainsi, cette protéine servira de protéine « cargo ».

Tau interagit avec un certain nombre de protéines impliquées dans des mécanismes de stress et notamment la protéine HSC 70 (Sarkar *et al.*, 2008). HSC 70 participe au transport de protéines dans le noyau des cellules, telles l'histone H1, la nucléoplasmine et l'antigène SV-40 (Imamoto *et al.*, 1992; Shi and Thomas, 1992). De plus, il existe une augmentation de la quantité de HSC 70 dans le noyau des neurones en condition de stress thermique (Sultan *et al.*, 2011). Cette corrélation entre la localisation de Tau et HSC70 en condition de stress suggère que cette dernière pourrait être impliquée dans les mécanismes de translocation de Tau dans le noyau de neurones.

Un stress hyperthermique induit la formation de dommages aux acides nucléiques dans les neurones déficients en protéine Tau *in vivo*

Nous avons étudié l'impact d'un stress hyperthermique sur l'intégrité de l'ADN chez des souris déficientes en protéines Tau. Nous avons observé une augmentation de la quantité de dommages à l'ADN chez les souris soumises au stress hyperthermique

contrairement aux souris contrôles. L'hyperthermie semble potentialiser l'effet délétère de l'absence de protéine Tau sur l'intégrité de l'ADN des neurones.

Le marquage TUNEL que nous avons observé à la suite du stress hyperthermique dans les souris déficientes en protéines Tau est à la fois nucléaire et cytoplasmique. Afin de savoir si ce marquage pouvait correspondre à des dommages à l'ADN mais aussi aux ARN, nous avons réalisé des traitements à l'aide d'enzymes DNase ou RNase sur des coupes de souris KO Tau ayant été soumises à un stress hyperthermique. Ces traitements montrent que le stress dans les souris déficientes en protéine Tau entraîne l'accumulation de dommages à l'ADN génomique mais également au niveau d'ARN cytoplasmiques et nucléaires dans les neurones hippocampaux. La protéine Tau possède donc un rôle plus global, dans le maintien de l'intégrité de l'ensemble des acides nucléiques *in vivo*.

A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas les mécanismes par lesquelles la protéine Tau est capable de protéger l'intégrité de l'ADN et d'ARN *in vivo*. Toutefois, des études *in vitro* ont montré que la protéine Tau est capable de se lier à l'ADN (QHuaa, 2003 ; Sultan *et al.*, 2011). De plus, il a été montré que l'utilisation d'un ligand spécifique du petit sillon de l'ADN diminuait la quantité de protéine Tau dans le noyau de cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de souris. Ainsi Tau pourrait protéger l'ADN des dommages induits par un stress en se liant directement ou indirectement à l'ADN (Sultan *et al.*, 2011). Il est donc possible qu'*in vivo*, Tau soit également capable de se lier à l'ADN directement ou indirectement au sein d'un complexe protéique et ainsi le protéger des dommages induits par le stress. Il est également possible que Tau soit impliquée dans des mécanismes de réparation de l'ADN en faisant partie d'un complexe protéique de réparation ou en modulant l'expression de gènes de réparation.

En plus de ce rôle dans la protection de l'ADN génomique, nous avons mis en évidence que la déficience en Tau altère l'intégrité d'ARN cytoplasmiques et nucléaires en condition de stress hyperthermique. En effet, les ARN sont constamment endommagés dans les cellules. L'accumulation de lésions au niveau des ARN entraîne une augmentation de la quantité de protéines non fonctionnelles dans les cellules. Ceci est très dommageable pour leur physiologie et c'est pourquoi l'élimination des ARN lésés est important. Ainsi la protéine Tau pourrait être impliquée dans le contrôle qualité des ARN. Jusqu'à récemment, il a été admis que ces ARN endommagés étaient uniquement

dégradés. Toutefois, des systèmes de réparation pour ces ARN ont été mis en évidence (Aas *et al*, 2003). Tau pourrait donc, directement ou indirectement, participer à ces phénomènes de réparation des ARN endommagés.

Les dommages aux acides nucléiques induits par un stress hyperthermique sont réversibles

Des dommages aux acides nucléiques sont induits par un stress hyperthermique dans l'hippocampe de souris déficientes en protéine Tau. Cependant des différences sont observées entre les deux régions de l'hippocampe que nous avons étudiées.

En effet, 24 heures après l'induction du stress, plus aucun marquage TUNEL n'est observé dans le gyrus dentelé des souris KO Tau. Ceci suggère que les acides nucléiques des neurones ne possèdent plus de dommages 24 heures après l'induction du stress. L'ADN génomique a été réparé et les ARN ont été dégradés ou réparés dans le gyrus dentelé.

Par contre, dans la CA1 des souris déficientes en protéine Tau, la diminution du marquage TUNEL n'est que de 40% 24 heures après le stress. Il semblerait donc que les neurones de la CA1 soient plus vulnérables aux dommages que les neurones du gyrus dentelé et que les systèmes de réparation et/ou de dégradation soient plus lents à se mettre en place. Des différences de vulnérabilité entre la CA1 et le gyrus dentelé ont déjà été décrites dans la littérature (Lalonde and Mielke, 2013). Toutefois, les causes de ces différences ne sont pas connues.

Lorsque l'on regarde la densité cellulaire dans l'hippocampe des souris, nous n'observons pas de différences dans le nombre de cellules marquées avec le DAPI entre avant et après un stress hyperthermique. Cela nous conforte dans le fait que le stress n'occasionnerait pas de mort cellulaire. Les dommages observés dans les neurones KO Tau soumis au stress sont donc très probablement réparés.

Nos résultats mettent en lumière un rôle essentiel pour la protéine Tau nucléaire *in vivo*. En effet, Tau est capable de protéger l'intégrité de l'ADN génomique et d'ARN en condition physiologique et de stress hyperthermique.

DISCUSSION

Oligomérisation de Tau et dommages aux acides nucléiques induits par un stress hyperthermique dans le modèle murin THY-Tau22

Etat de phosphorylation de Tau et translocation nucléaire de Tau

Peu de chose sont connues dans la littérature sur l'état de phosphorylation de la protéine Tau nucléaire. Les premières études menées par immunohistochimie utilisent le plus souvent l'anticorps Tau 1 qui reconnaît la protéine Tau lorsqu'elle est déphosphorylée sur les sites compris entre les sérines 195 et 202. Dans notre étude, nous avons mis en évidence que la quantité de protéine Tau nucléaire augmente sous l'effet d'un stress hyperthermique dans le cortex de souris sauvage. Cette protéine Tau nucléaire a été détectée également avec l'anticorps Tau 1. Elle est donc sous une forme déphosphorylée au moins sur les épitopes compris entre les sérines 195 et 202. L'état de phosphorylation de Tau semble donc être un élément important dans ces mécanismes de translocation.

Des souris transgéniques THY-Tau22 ont été soumises au protocole de stress hyperthermique. Dans ces souris, exprimant une protéine Tau humaine qui s'hyperphosphoryle et s'agrège avec le temps, nous n'observons pas d'augmentation de la quantité de protéine Tau dans le noyau. Ces résultats ont été obtenus par immunoempreinte et immunohistochimie.

On ne peut exclure que les mutations sur la protéine Tau humaine surexprimée dans les souris THY-Tau22, empêchent sa translocation nucléaire. Des modifications de la conformation de la protéine pourraient être causées par ses mutations et empêcher son passage à travers la membrane plasmique. Des études complémentaires afin de savoir si l'état de phosphorylation de Tau est essentiel dans son transport nucléaire sont nécessaires. L'expression de différentes protéines Tau mutées sur des acides aminés déterminés afin de mimer un état phosphorylé constitutif dans des cultures primaires de

neurones corticaux d'embryons de souris, pourrait nous aider à répondre à cette question.

Il a été montré dans la littérature qu'un stress induit par le formaldéhyde entraîne l'accumulation nucléaire de l'enzyme GSK 3 beta dans des cellules de lignées cellulaires de neuroblastomes et dans des cerveaux de souris (Lu *et al.*, 2013). Le stress oxydant est un des effets majeurs de l'exposition au formaldéhyde (Gurel *et al.*, 2005). GSK 3 beta est une kinase importante dans la phosphorylation de Tau. On peut donc imaginer que le stress induise une augmentation de l'enzyme GSK 3 beta dans le noyau des neurones et phosphoryle alors la protéine Tau nucléaire.

Dans notre modèle, nous avons étudié l'état de phosphorylation de Tau dans les souris THY Tau22 soumises au stress. Une augmentation du marquage à l'aide des anticorps AT8 et PT212 est observée dans les neurones présentant des dommages aux acides nucléiques. Cela suggère que Tau est plutôt phosphorylée dans le noyau des neurones et renforce l'hypothèse qu'une Tau hyperphosphorylée ne peut transloquer au niveau du compartiment nucléaire.

Un stress hyperthermique induit la formation d'oligomères de Tau *in vivo*

Afin de savoir si la pathologie Tau a un effet délétère sur son rôle protecteur vis à vis des acides nucléiques, nous avons étudié leur intégrité dans un modèle de souris transgéniques de pathologie Tau, les souris THY-Tau22. Ces souris ont été soumises ou non à un stress hyperthermique. Nous avons étudié l'intégrité des acides nucléiques chez des souris THY-Tau22 âgées de 3, 5 et 7 mois afin d'étudier respectivement l'effet d'une pathologie Tau modérée ou sévère. Nous nous sommes intéressés plus à l'hippocampe, lieu de stockage des informations mnésiques, et plus particulièrement à la CA1. Le stress hyperthermique induit l'accumulation de dommages aux acides nucléiques dans les neurones de la CA1 des souris THY-Tau22 âgées de 5 mois principalement. Aucun dommage aux acides nucléiques n'a été observé dans la CA1 des souris THY-Tau22 de 3 mois soumises au stress hyperthermique et peu de dommages dans les souris âgées de 7 mois. Ceci suggère que les neurones présentant une pathologie Tau précoce sont les plus sensibles au stress hyperthermique et aux

dommages. Le stress hyperthermique induit donc l'accumulation de dommages aux acides nucléiques dans les neurones possédant une pathologie Tau précoce.

Une des caractéristiques principales de la maladie d'Alzheimer est la présence de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée formant les dégénérescences neurofibrillaires. Il est maintenant admis dans la littérature que, bien plus que les agrégats insolubles de protéine Tau, ce sont des petites formes oligomériques solubles de Tau qui sont ses formes toxiques. Comprendre les mécanismes impliqués dans l'oligomérisation de Tau est donc essentiel afin d'élucider l'apparition de la maladie d'Alzheimer et ainsi proposer des nouvelles méthodes thérapeutiques.

A l'aide de deux anticorps reconnaissant les formes oligomériques préfibrillaires de Tau obtenus dans le cadre de collaborations avec L. Binder et R. Kaye, nous avons montré qu'un stress hyperthermique induit la formation d'oligomères de Tau *in vivo*. Ces oligomères sont présents spécifiquement au niveau du cytoplasme et du noyau des neurones possédant des dommages aux acides nucléiques.

Les causes de l'oligomérisation de Tau dans notre modèle sont inconnues. Il est tout à fait possible que les ROS produits par le stress hyperthermique, servent d'agents inducteurs à la formation d'oligomères de Tau. Cela a déjà été montré dans un tout autre modèle murin. Hawkins *et collaborateurs* ont décrit un modèle de rat permettant d'étudier l'impact des traumatismes crâniens qui sont connus pour induire une forte augmentation de ROS. La répétition de traumatismes crâniens peut entraîner le développement de démences que l'on nomme démences pugilistiques (Tokuda *et al.*, 1990). Ces démences sont des Tauopathies caractérisées par l'accumulation d'agrégats de protéine Tau. Dans le modèle de rat, la répétition de traumatismes crâniens entraîne la formation d'oligomères de Tau *in vivo* (Hawkins *et al.*, 2013). Ces traumatismes sont également à l'origine d'une augmentation du stress oxydant cérébral (Cornelius *et al.*, 2013). Le stress oxydant pourrait donc jouer un rôle important dans la formation des oligomères de Tau *in vivo*.

Les oligomères sont principalement détectés dans les souris THY-Tau22 âgées de 5 mois spécifiquement dans les neurones dont les acides nucléiques sont endommagés. Nous observons donc la perte de la fonction nucléaire physiologique de la protéine Tau lorsqu'elle est majoritairement sous une forme oligomérisée.

D'après nos résultats, il existe une fenêtre de temps lorsque la protéine Tau est modérément phosphorylée où le stress hyperthermique en induisant l'oligomérisation de la protéine Tau entrainerait l'altération des acides nucléiques dans les neurones. Prévenir ces phénomènes pourrait donc ralentir la progression de la maladie d'Alzheimer.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitements efficaces capables de prévenir la maladie d'Alzheimer. Au vu de nos résultats, l'impact possible de l'altération de la fonction protectrice de Tau vis à vis des acides nucléiques dans la physiopathologie des Tauopathies n'est pas à négliger. Prévenir son oligomérisation devrait permettre d'empêcher la perte de la fonction protectrice de Tau vis à vis des acides nucléiques.

DISCUSSION

Caractérisation de l'état de phosphorylation de la protéine Tau associée aux radeaux lipidiques en conditions physiologique et pathologique

Etat de phosphorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques en condition physiologique

Nos résultats indiquent que la protéine Tau est localisée au niveau des radeaux lipidiques dans les conditions physiologiques et pathologiques. Cependant peu d'études ont été menées sur l'état de phosphorylation de la protéine Tau à ce niveau. C'est pourquoi nous avons caractérisé cet état de phosphorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques.

Nous avons identifié que la protéine Tau au niveau des radeaux lipidiques est principalement déphosphorylée notamment entre les sérines 195 et 202 dans les conditions physiologiques, que ce soit dans le cortex de souris ou dans du cerveau humain.

Etat de phosphorylation de Tau au niveau des radeaux lipidiques en condition pathologique

Dans la littérature, une seule étude montre que Tau est phosphorylée au niveau des épitopes 396 et 404 de l'isoforme la plus longue dans les cerveaux de patients atteints de la MA. Aucune caractérisation précise de l'état de phosphorylation de Tau en condition pathologique n'a été menée. Nous avons donc étudié cet état de phosphorylation dans le cortex de patients atteints de la MA.

Nous avons observé qu'à ce niveau, la protéine Tau est hyperphosphorylée. Elle est en effet reconnue par tous les anticorps testés. Tau peut se présenter également sous forme de monomères, d'oligomères et d'agrégats au niveau des radeaux lipidiques du cortex de

patients atteints de la MA. Ces résultats ne sont pas étonnants puisque dans la MA, Tau peut se présenter sous toutes ces différentes formes.

Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que les radeaux lipidiques pourraient jouer un rôle clé dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer notamment au niveau des phénomènes de nucléation de Tau puisqu'ils pourraient être le point de départ de la dimérisation de Tau puis de son agrégation au niveau du cytosol des neurones.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de mettre en évidence la fonctionnalité de Tau nucléaire *in vivo*. Tau est capable de protéger l'ADN génomique des neurones corticaux et hippocampiques de dommages en conditions physiologique et de stress hyperthermique. L'intégrité des ARN nucléaires et cytoplasmiques est également préservée en présence de protéine Tau. Ceci suggère que cette protéine pourrait avoir un rôle dans des mécanismes de réparation de l'ADN et dans le contrôle qualité des ARN. Dans l'avenir, il serait intéressant d'étudier les modifications géniques produites dans les neurones où l'intégrité des acides nucléiques est altérée.

Une des caractéristiques principales de la maladie d'Alzheimer est la présence de protéine Tau hyper et anormalement phosphorylée formant les dégénérescences neurofibrillaires. Il est maintenant admis dans la littérature que, bien plus que les agrégats insolubles de protéine Tau, ce sont des petites formes oligomériques solubles de Tau qui sont ses formes toxiques. Comprendre les mécanismes impliqués dans l'oligomérisation de Tau est donc essentiel afin d'élucider l'apparition de la maladie d'Alzheimer et ainsi proposer des nouvelles méthodes thérapeutiques. Pour s'oligomériser, la protéine Tau a toujours besoin d'un agent inducteur. Or les radeaux lipidiques pourraient être un point de départ pour la polymérisation de Tau.

L'utilisation d'un modèle transgénique de pathologie Tau, le modèle THY-Tau22, nous a permis de mettre en évidence qu'un stress hyperthermique entraîne l'oligomérisation de Tau dans les neurones modérément phosphorylés. Prévenir cette oligomérisation pourrait donc empêcher la perte de fonction protectrice de Tau vis à vis de l'intégrité des acides nucléiques. En perspective, il serait intéressant de savoir si en inhibant la production de ROS dans le cerveau des souris, l'oligomérisation de Tau est diminuée. Pour ce faire, l'injection chez les souris d'une molécule anti-oxydante telle que le bleu de méthylène, avant l'induction d'un stress hyperthermique, nous permettrait de répondre à cette question.

BIBLIOGRAPHIE

A

Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vågbø, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjørfs, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., and Krokan, H.E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 20; 537421:859-63.

Abe, T., Tohgi, H., Isobe, C., Murata, T., and Sato, C. (2002). Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 70, 447–450.

Adamec, E., Murrell, J.R., Takao, M., Hobbs, W., Nixon, R.A., Ghetti, B., and Vonsattel, J.P. (2002). P301L tauopathy: confocal immunofluorescence study of perinuclear aggregation of the mutated protein. *J. Neurol. Sci.* 200, 85–93.

Ali, Y.O., Ruan, K., and Zhai, R.G. (2012). NMNAT suppresses tau-induced neurodegeneration by promoting clearance of hyperphosphorylated tau oligomers in a *Drosophila* model of tauopathy. *Human Molecular Genetics* 21, 237–250.

Álvarez, G., Aldudo, J., Alonso, M., Santana, S., and Valdivieso, F. (2012). Herpes simplex virus type 1 induces nuclear accumulation of hyperphosphorylated tau in neuronal cells. *J. Neurosci. Res.* n/a–n/a.

Andreadis, A., Brown, W.M., Kosik, K.S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry.* 3;31(43):10626-33.

Arrasate, M., Pérez, M., and Avila, J. (2000). Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem. Res.* 25, 43–50.

Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T. (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology.* 42(3 Pt 1):631-9.

Asai M., Hattori C., Szabo B., Sasagawa N., Maruyama K., Tanuma S. et Ishiura S., Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase (2003).

Biochem Biophys Res Commun 301, 231-235

B

Baas, P.W., Pienkowski, T.P., and Kosik, K.S. (1991). Processes induced by tau expression in Sf9 cells have an axon-like microtubule organization. *The Journal of Cell Biology*.

Ballatore, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 663–672.

Barghorn, S., Zheng-Fischhöfer, Q., Ackmann, M., Biernat, J., Bergen, von, M., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Structure, microtubule interactions, and paired helical filament aggregation by tau mutants of frontotemporal dementias. *Biochemistry* 39, 11714–11721.

Baumann, K., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Piwnica-Worms, H., and Mandelkow, E. (1993). Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Letters* 336, 417–424.

Benes, F.M., Kwok, E.W., Vincent, S.L., and Todtenkopf, M.S. (1998). A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol. Psychiatry* 44, 88–97.

Bergen, von, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (2000). Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5129–5134.

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. *Journal of Neuroscience* 27, 3650–3662.

Biernat, J., Gustke, N., Drewes, G., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (1993) Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 11(1):153-63.

Binder, L.I., Guillozet-Bongaarts, A.L., Garcia-Sierra, F., and Berry, R.W. (2005). Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1739, 216–223.

Borgesius, N.Z., de Waard, M.C., van der Pluijm, I., Omrani, A., Zondag, G.C.M., van der Horst, G.T.J., Melton, D.W., Hoeijmakers, J.H.J., Jaarsma, D., and Elgersma, Y. (2011). Accelerated age-related cognitive decline and neurodegeneration, caused by deficient DNA repair. *Journal of Neuroscience* 31, 12543–12553.

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

Braak, H., and Del Tredici, K. (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol* 121, 171–181.

Brady, R.M., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1995). Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol. Aging* 16, 479–486.

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

Bretteville, A., and Planel, E. (2008). Tau aggregates: toxic, inert, or protective species? *J Alzheimers Dis* 14, 431–436.

Breuzard, G., Hubert, P., Nouar, R., De Bessa, T., Devred, F., Barbier, P., Sturgis, J.N., and Peyrot, V. (2013). Molecular mechanisms of Tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells. *Journal of Cell Science* 126, 2810–2819.

Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 301–307.

Bruskov, V.I., Malakhova, L.V., Masalimov, Z.K., and Chernikov, A.V. (2002). Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage

to DNA. *Nucleic Acids Research* 30, 1354–1363.

Buée, L., Bussièrre, T., Buée-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.

Buée-Scherrer., V., Buée, L., Hof, P.R., Leveugle, B., Gilles , C., Loerzel, A.J., Perl, D.P., Delacourte, A. (1995) Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. Immunochemical characterization of tau proteins. *Am J Pathol.* 146(4):924-32.

Buée Scherrer, V., Hof, P.R., Buée, L., Leveugle, B., Vermersch, P., Perl, D.P., Olanow, C.W., Delacourte, A. (1996) Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick's disease. *Acta Neuropathol.* 91(4):351-9.

Burdick, D., Kosmoski, J., Knauer, M.F., Glabe, C.G. (1997) Preferential adsorption, internalization and resistance to degradation of the major isoform of the Alzheimer's amyloid peptide, A beta 1-42, in differentiated PC12 cells. *Brain Res.* 746(1-2):275-84.

C

Caceres, A., and Kosik, K.S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461–463.

Camero, S., Benítez, M.J., Barrantes, A., Ayuso, J.M., Cuadros, R., Avila, J., and Jiménez, J.S. (2013). Tau Protein Provides DNA with Thermodynamic and Structural Features which are Similar to those Found in Histone-DNA Complex. *J. Alzheimers Dis.* Nov 19.

Canugovi, C.C., Yoon, J.S.J., Feldman, N.H.N., Croteau, D.L.D., Mattson, M.P.M., and Bohr, V.A.V. (2012). Endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) promotes short-term spatial memory retention and protects from ischemic stroke-induced brain dysfunction and death in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 109, 14948–14953.

Carmel, G.G., Mager, E.M.E., Binder, L.I.L., and Kuret, J.J. (1996). The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* *271*, 32789–32795.

Chang, E., Kim, S., Yin, H., Nagaraja, H.N., and Kuret, J. (2008). Pathogenic missense MAPT mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps. *Journal of Neurochemistry* *107*, 1113–1123.

Chartier-Harlin, M.C., Crawford, F., Houlden, H., Warren, A., Hughes, D., Fidani, L., Goate, A., Rossor, M., Roques, P., and Hardy, J. (1991). Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* *353*, 844–846.

Chirita, C.N., Necula, M., and Kuret, J. (2003). Anionic micelles and vesicles induce tau fibrillization in vitro. *J. Biol. Chem.* *278*, 25644–25650.

Cho, J.-H., and Johnson, G.V. (2004). Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules. *Journal of Neurochemistry* *88*, 349–358.

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

Corkin, S., Amaral, D.G., González, R.G., Johnson, K.A., and Hyman, B.T. (1997). H. M.'s medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience* *17*, 3964–3979.

Cornelius, C., Crupi, R., Calabrese, V., Graziano, A., Milone, P., Pennisi, G., Radak, Z., Calabrese, E.J., and Cuzzocrea, S. (2013). Traumatic Brain Injury: Oxidative Stress and Neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 836–853.

Correas, I.I., Díaz-Nido, J.J., and Avila, J.J. (1992). Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J. Biol. Chem.* *267*, 15721–15728.

D

Daly, N.L., Hoffmann, R., Otvos, L., and Craik, D.J. (2000). Role of Phosphorylation in the Conformation of τ Peptides Implicated in Alzheimer's Disease. *Biochemistry* 39, 9039–9046.

Dasuri K, Zhang L, Keller JN. (2013) Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med.* 62:170-85.

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. *Journal of Cell Science* 114, 1179–1187.

De Barreda, E.G., Dawson, H.N., Vitek, M.P., and Avila, J. (2010). Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression. *FEBS Letters* 584, 2265–2270.

De Toledo Ferraz Alves, T.C., Ferreira, L.K., Wajngarten, M., and Busatto, G.F. (2010). Cardiac disorders as risk factors for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20, 749–763.

Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E.S., Manno, M., and Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 177, 132–148.

Delacourte, A., Robitaille, Y., Sergeant, N., Buée, L., Hof, P.R., Wattez, A., Laroche-Cholette, A., Mathieu, J., Chagnon, P., Gauvreau, D.. (1996) Specific pathological Tau protein variants characterize Pick's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55(2):159-68.

Delacourte, A., David, J.P., Sergeant, N., Buée, L., Wattez, A., Vermersch, P., Ghozali, F., Fallet-Bianco, C., Pasquier, F., Lebert, F., Petit, H., Di Menza, C. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology.* 52(6):1158-65.

Derkinderen, P., Scales, T.M.E., 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. *Journal of Neuroscience* 25, 6584–6593.

Ding, Q., Markesbery, W.R., Chen, Q., Li, F., and Keller, J.N. (2005). Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 25, 9171–9175.

Dixit, R., Ross, J.L., Goldman, Y.E., and Holzbaur, E.L.F. (2008). Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau. *Science* 319, 1086–1089.

Dobson, C.M.C. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884–890.

Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Cobb, M.H., Kirschner, M.W. (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell*. 3(10):1141-54.

Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1997). MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* 89, 297–308.

Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Doring, F., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Goris, J., Doree, M., and Mandelkow, E. (1992). Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *Embo J*. 11, 2131–2138.

E

Ebbert, M.T.W., Ridge, P.G., Wilson, A.R., Sharp, A.R., Bailey, M., Norton, M.C., Tschanz, J.T., Munger, R.G., Corcoran, C.D., and Kauwe, J.S.K. (2013). Population-based Analysis of Alzheimer's Disease Risk Alleles Implicates Genetic Interactions. *Biol. Psychiatry*.

Eckermann, K., Mocanu, M.-M., Khlistunova, I., Biernat, J., Nissen, A., Hofmann, A., Schönig, K., Bujard, H., Haemisch, A., Mandelkow, E., et al. (2007). The beta-propensity of Tau determines aggregation and synaptic loss in inducible mouse models of tauopathy. *J. Biol. Chem*. 282, 31755–31765.

Edbauer D., Winkler E., Haass C. et Steiner H., Presenilin and nicastrin regulate each

other and determine amyloid beta-peptide production via complex formation (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8666-8671.

Ekinci, F.J., and Shea, T.B. (2000). Phosphorylation of tau alters its association with the plasma membrane. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 497–508.

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. *Journal of Cell Science* 107 (Pt 4), 869–879.

F

Fei, G., Guo, C., Sun, H.-S., and Feng, Z.-P. (2007). Chronic hypoxia stress-induced differential modulation of heat-shock protein 70 and presynaptic proteins. *Journal of Neurochemistry* 100, 50–61.

Fox, L.M., William, C.M., Adamowicz, D.H., Pitstick, R., Carlson, G.A., Spires-Jones, T.L., and Hyman, B.T. (2011). Soluble tau species, not neurofibrillary aggregates, disrupt neural system integration in a tau transgenic model. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 588.

Francis R., McGrath G., Zhang J., Ruddy D. A., Sym M., Apfeld J., Nicoll M., Maxwell M., Hai B., Ellis M. C., Parks A. L., Xu W., Li J., Gurney M., Myers R. L., Himes C. S., Hiebsch R., Ruble C., Nye J. S. et Curtis D.(2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3, 85-97.

G

Gabbita, S.P.S., Lovell, M.A.M., and Markesbery, W.R.W. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* 71, 2034–2040.

Galas, M.-C., Dourlen, P., Bégard, S., Ando, K., Blum, D., Hamdane, M., and Buée, L.

(2006). The peptidylprolyl cis/trans-isomerase Pin1 modulates stress-induced dephosphorylation of Tau in neurons. Implication in a pathological mechanism related to Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* *281*, 19296–19304.

Gamblin, T.C, King, M.E., Kuret, J., Berry, R.W., Binder, L.I. (2000) Oxidative regulation of fatty acid-induced tau polymerization. *Biochemistry* *39*(46):14203-10.

Gasparini, L., Terni, B., and Spillantini, M.G. (2007). Frontotemporal dementia with tau pathology. *Neurodegener Dis* *4*, 236–253.

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

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*, 4225–4230.

Goedert, M., Hasegawa, M., Jakes, R., Lawler, S., Cuenda, A., and Cohen, P. (1997). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. *FEBS Letters* *409*, 57–62.

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)*, 871–877.

Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M.G., Hasegawa, M., Smith, M.J., and Crowther, R.A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* *383*, 550–553.

Goedert, M., Ghetti, B., Spillantini, M.G.. (2012) Frontotemporal dementia: implications for understanding Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* *2*(2):a006254.

Götz, J., Probst, A., Spillantini, M.G., Schäfer, T., Jakes, R., Bürki, 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, 1304–1313.

Greenwood, J.A., and Johnson, G.V. (1995). Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp. Cell Res.* 220, 332–337.

Gurel, A., Coskun, O., Armutcu, F., Kanter, M., and Ozen, O.A. (2005). Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J. Chem. Neuroanat.* 29, 173–178.

H

Hamdane, M., Dourlen, P., Bretteville, A., Sambo, A.-V., Ferreira, S., Ando, K., Kerdraon, O., Bégard, S., Geay, L., Lippens, G., et al. (2006). Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 155–160.

Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., and Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488–491.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1088–1093.

Hasegawa, M., Smith, M.J., and Goedert, M. (1998). Tau proteins with FTDP-17 mutations have a reduced ability to promote microtubule assembly. *FEBS Letters* 437, 207–210.

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 Letters* 443, 93–96.

Hawkins, B.E., Krishnamurthy, S., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Prough, D.S.,

Jackson, G.R., DeWitt, D.S., and Kaye, R. (2013). Rapid accumulation of endogenous tau oligomers in a rat model of traumatic brain injury: possible link between traumatic brain injury and sporadic tauopathies. *Journal of Biological Chemistry* 288, 17042–17050.

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

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S.P., Wu, J.F., Carney, J.M., et al. (1995) Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 65(5):2146-56.

Hicks, D.A., Nalivaeva, N.N., Turner, A.J. (2012) Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signaling. *Front Physiol.* 3:189

Hikosou, R., Kurabayashi, Y., Doumoto, M., Hoshitoku, K., Mizushima, F., Minoura, K., Tomoo, K., and Ishida, T. (2007). Effect of DNA on filament formation of tau microtubule-binding domain: structural dependence of DNA. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 1030–1033.

Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Kobayashi, N., Pfister, K.K., Bloom, G.S., and Brady, S.T. (1991). Kinesin associates with anterogradely transported membranous organelles in vivo. *The Journal of Cell Biology* 114, 295–302.

Hirokawa, N., Shiomura, Y., and Okabe, S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *The Journal of Cell Biology* 107, 1449–1459.

Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.

Hof, P.R., Bouras, C., Buée, L., Delacourte, A., Perl, D.P., Morrison, J.H.(1992) Differential distribution of neurofibrillary tangles in the cerebral cortex of dementia pugilistica and Alzheimer's disease cases. *Acta Neuropathol.* 85(1):23-30.

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, 1914–1917.

Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.-L., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081.

Hua, Q., and He, R.-Q. (2003). Tau could protect DNA double helix structure. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1645, 205–211.

Hunt, C., and Morimoto, R.I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6455–6459.

Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., and Grover, A. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.

I

Ikegami, S, A Harada, and Hirokawa N. (2000). Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neuroscience Letters* 279(3): 129–132.

Illenberger, S.S., Zheng-Fischhöfer, Q.Q., Preuss, U.U., Stamer, K.K., Baumann, K.K., Trinczek, B.B., Biernat, J.J., Godemann, R.R., Mandelkow, E.M.E., and Mandelkow, E.E. (1998). The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* 9, 1495–1512.

Imamoto, N., Matsuoka, Y., Kurihara, T., Kohno, K., Miyagi, M., Sakiyama, F., Okada, Y., Tsunasawa, S., Yoneda, Y. (1992) Antibodies against 70-kD heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins. *J Cell Biol.* 119(5):1047-61.

Ittner, L.M., Fath, T., Ke, Y.D., Bi, M., van Eersel, J., Li, K.M., Gunning, P., and Götz, J.

(2008). Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 15997–16002.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., and Götz, J. (2009). Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 20909–20916.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* *142*, 387–397.

J

Jancsik, V., Filliol, D., Rendon, A. (1996) Tau proteins bind to kinesin and modulate its activation by microtubules. *Neurobiology (Bp)*. *4*(4):417-29.

Jicha, G.A., Weaver, C., Lane, E., Vianna, C., Kress, Y., Rockwood, J., and Davies, P. (1999). cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* *19*, 7486–7494.

K

Kamboh, M.I., Demirci, F.Y., Wang, X., Minster, R.L., Carrasquillo, M.M., Pankratz, V.S., Younkin, S.G., Saykin, A.J., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Jun, G., et al. (2012). Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* *2*, e117.

Kampers, T., Friedhoff, P., Biernat, J., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1996). RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Letters* *399*, 344–349.

Kanaan, N.M., Morfini, G., Pigino, G., LaPointe, N.E., Andreadis, A., Song, Y., Leitman,

E., Binder, L.I., and Brady, S.T. (2012). Phosphorylation in the amino terminus of tau prevents inhibition of anterograde axonal transport. *Neurobiol. Aging* 33, 826.e15–e30.

Kanaan, N.M., Morfini, G.A., LaPointe, N.E., Pigino, G.F., Patterson, K.R., Song, Y., Andreadis, A., Fu, Y., Brady, S.T., and Binder, L.I. (2011). Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *Journal of Neuroscience* 31, 9858–9868.

Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L.H., Wen-Lang, L., Dickson, D.W., Murakami, T., Matsubara, E., Abe, K., Ashe, K.H., Younkin, S.G. (2004) Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 24(15):3801-9.

Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., and Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012, 1–13.

Korade, Z., and Kenworthy, A.K. (2008). Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265–1273.

Köpke, 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, 24374–24384.

Kroner, Z. (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev* 14, 373–379.

Kruman, I.I., Henderson, G.I., and Bergeson, S.E. (2012). DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 237, 740–747.

Krylova, S.M., Musheev, M., Nutiu, R., Li, Y., Lee, G., and Krylov, S.N. (2005). Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically – the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures. *FEBS Letters* 579, 1371–1375.

Ksiezak-Reding, H., Morgan, K., Mattiace, L.A., Davies, P., Liu, W.K., Yen, S.H.,

Weidenheim, K., and Dickson, D.W. (1994). Ultrastructure and biochemical composition of paired helical filaments in corticobasal degeneration. *Am. J. Pathol.* *145*, 1496–1508.

L

La Maestra, S., Kisby, G.E., Micale, R.T., Johnson, J., Kow, Y.W., Bao, G., Sheppard, C., Stanfield, S., Tran, H., Woltjer, R.L., et al. (2011). Cigarette Smoke Induces DNA Damage and Alters Base-Excision Repair and Tau Levels in the Brain of Neonatal Mice. *Toxicological Sciences* *123*, 471–479.

Lagouge, M., and Larsson, N.G. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J. Intern. Med.* *273*, 529–543.

Lalonde, C.C., and Mielke, J.G. (2013). Selective vulnerability of hippocampal subfields to oxygen-glucose deprivation is a function of animal age. *Brain Research*.

Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *41*, 1094–1099.

Lambert, M.P., Sabo, S., Zhang, C., Enam, S.A., and Klein, W.L. (1995). Constitutive Alzheimer's-type tau epitopes in a neuritogenic rat CNS cell line. *Neurobiol. Aging* *16*, 583–589.

LaPointe, N.E., Morfini, G., Pigino, G., Gaisina, I.N., Kozikowski, A.P., Binder, L.I., and Brady, S.T. (2009). The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: Implications for filament toxicity. *J. Neurosci. Res.* *87*, 440–451.

Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Clos, A.L., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Molecular Neurodegeneration* *6*, 39.

Lasagna-Reeves, C.A., Castillo-Carranza, D.L., Sengupta, U., Sarmiento, J., Troncoso, J., Jackson, G.R., and Kaye, R. (2012). Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal* *26*, 1946–1959.

Lazarov O, Morfini GA, Pigino G, Gadadhar A, Chen X, Robinson J, Ho H, Brady ST, Sisodia SS.(2007) Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *J Neurosci.* 27;27(26):7011-20.

Leboucher, A., Laurent, C., Fernandez-Gomez, F.-J., Burnouf, S., Troquier, L., Eddarkaoui, S., Demeyer, D., Caillierez, R., Zommer, N., Vallez, E., et al. (2013). Detrimental effects of diet-induced obesity on τ pathology are independent of insulin resistance in τ transgenic mice. *CORD Conference Proceedings 62*, 1681–1688.

Lebouvier, T., Scales, T.M.E., Hanger, D.P., Geahlen, R.L., Lardeux, B., Reynolds, C.H., Anderton, B.H., and Derkinderen, P. (2008a). The microtubule-associated protein tau is phosphorylated by Syk. *Biochim Biophys Acta 1783*, 188–192.

Lebouvier, T., Scales, T.M.E., Williamson, R., Noble, W., Duyckaerts, C., Hanger, D.P., Reynolds, C.H., Anderton, B.H., and Derkinderen, P. (2008b). The microtubule-associated protein tau is also phosphorylated on tyrosine. *J Alzheimers Dis 18*, 1–9.

Lee, G. (2005). Tau and src family tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta 1739*, 323–330.

Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., and Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *Journal of Cell Science 111 (Pt 21)*, 3167–3177.

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. *Journal of Neuroscience 24*, 2304–2312.

Lee, J.W.J., Beebe, K.K., Nangle, L.A.L., Jang, J.J., Longo-Guess, C.M.C., Cook, S.A.S., Davisson, M.T.M., Sundberg, J.P.J., Schimmel, P.P., and Ackerman, S.L.S. (2006). Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature 443*, 50–55.

Liang, X., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Bornmann, W., Tempst, P., and Resh, M.D. (2001). Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated

fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J. Biol. Chem.* 276, 30987–30994.

Lindwall, G., and Cole, R.D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 259, 5301–5305.

Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.-X. (2005). Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1942–1950.

Loomis, P.A., Howard, T.H., Castleberry, R.P., and Binder, L.I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 8422–8426.

Love, S., Bridges, L.R., Case, C.P. (1995) Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain.* 118 (Pt 1):119-29.

Lu, J., Miao, J., Su, T., Liu, Y., and He, R. (2013). Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1830, 4102–4116.

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, 784–788.

Luo, M.-H., Tse, S.-W., Memmott, J., and Andreadis, A. (2004). Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *Journal of Neurochemistry* 90, 340–351.

M

Ma, Q.L., Zuo, X., Yang, F., Ubeda, O.J., Gant, D.J., Alaverdyan, M., Teng, E., Hu, S., Chen, P.P., Maiti, P., Teter, B., Cole, G.M., Frautschy, S.A. (2013) Curcumin suppresses soluble tau dimers and corrects molecular chaperone, synaptic, and behavioral deficits in aged human tau transgenic mice. *J Biol Chem.* 288(6):4056-65.

Maas, T., Eidenmüller, 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, 15733–15740.

Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, M., Yoshiike, Y., Kim, H., Miyasaka, T., Murayama, S., Ikai, A., and Takashima, A. (2007). Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* 46, 3856–3861.

Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., and Spillantini, M.G. (2007). Interaction of tau protein with the dynactin complex. *Embo J.* 26, 4546–4554.

Martin, L., Latypova, X., and Terro, F. (2011). Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 58, 458–471.

Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L., and Terro, F. (2013). Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A. *Ageing Res. Rev.* 12, 39–49.

McKinney, R.A. (2010). Excitatory amino acid involvement in dendritic spine formation, maintenance and remodelling. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 107–116.

Migliore, L., Fontana, I., Trippi, F., Colognato, R., Coppedè, F., Tognoni, G., Nucciarone, B., and Siciliano, G. (2005). Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol. Aging* 26, 567–573.

Mocanu, M.M., Nissen, A., Eckermann, K., Khlistunova, I., Biernat, J., Drexler, D., Petrova, O., Schönig, K., Bujard, H., Mandelkow, E., Zhou, L., Rune, G., Mandelkow, E.M. (2008) The potential for beta-structure in the repeat domain of tau protein determines aggregation, synaptic decay, neuronal loss, and coassembly with endogenous Tau in inducible mouse models of tauopathy. *J Neurosci.* 28(3):737-48.

Monroy-Ramírez, H.C., Basurto-Islas, G., Mena, R., Cisneros, B., Binder, L.I., Avila, J., and Garcia-Sierra, F. (2013). Alterations in the nuclear architecture produced by the overexpression of tau protein in neuroblastoma cells. *J Alzheimers Dis* 36, 503–520.

Morfini G, Pigino G, Mizuno N, Kikkawa M, Brady ST (2007). Tau binding to

microtubules does not directly affect microtubule-based vesicle motility. *J Neurosci Res.* ; 85(12):2620-30.

Moser, E., Moser, M.B., and Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *Journal of Neuroscience* 13, 3916–3925.

Moser, M.B.M., Moser, E.I.E., Forrest, E.E., Andersen, P.P., and Morris, R.G.R. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9697–9701.

Morsch, R., Simon, W., Coleman, P.D. (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58(2):188-97.

Mullan, M., Houlden, H., Windelspecht, M., Fidani, L., Lombardi, C., Diaz, P., Rossor, M., Crook, R., Hardy, J., and Duff, K. (1992). A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat. Genet.* 2, 340–342.

Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Barnham, K.J., Irie, K., Shirasawa, T., Shimizu, T. (2011) SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.* ;286(52):44557-68.

N

Neve, R.L, Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., 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(3):271-80.

Nunomura, A.A., Perry, G.G., Pappolla, M.A.M., Wade, R.R., Hirai, K.K., Chiba, S.S., and Smith, M.A.M. (1999). RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 19, 1959–1964.

Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E.K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C.S., Petersen, R.B., Smith, M.A. (2001) Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(8):759-67.

Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, Nakamura M, McKeel DW Jr, Tabaton M, Lee HG, Smith MA, Perry G, Zhu X. (2012). The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71(3):233-41.

P

Padmaraju, V., Indi, S.S., Rao, K.S. (2010) New evidences on Tau-DNA interactions and relevance to neurodegeneration. *Neurochem Int.* 1):51-7.

Papasozomenos, S.C., and Su, Y. (1991). Altered phosphorylation of tau protein in heat-shocked rats and patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 88, 4543–4547.

Paschal, B.M.B., and Vallee, R.B.R. (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature* 330, 181–183.

Patterson, K.R., Remmers, C., Fu, Y., Brooker, S., Kanaan, N.M., Vana, L., Ward, S., Reyes, J.F., Philibert, K., Glucksman, M.J., et al. (2011). Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry* 286, 23063–23076.

Pawelzik, H., Hughes, D.I., and Thomson, A.M. (2002). Physiological and morphological diversity of immunocytochemically defined parvalbumin- and cholecystokinin-positive interneurons in CA1 of the adult rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 443, 346–367.

Q

QHuaa, R.-Q.N.M.-H.A.I.-I.A. (2003). Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 1-9.

R

Reynolds, C.H., Garwood, C.J., Wray, S., Price, C., Kellie, S., Perera, T., Zvelebil, M., Yang, A., Sheppard, P.W., Varndell, I.M., et al. (2008). Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase Cgamma1, Grb2, and Src family kinases. *J. Biol. Chem.* 283, 18177–18186.

Reynolds, M.R., Berry, R.W., and Binder, L.I. (2005). Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry* 44, 1690–1700.

Riederer, I.M., Schiffrin, M., Kövari, E., Bouras, C., and Riederer, B.M. (2009). Ubiquitination and cysteine nitrosylation during aging and Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin* 80, 233–241.

Ross, C.A.C., and Poirier, M.A.M. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 *Suppl*, S10–S17.

Rossi, G., Conconi, D., Panzeri, E., Redaelli, S., Piccoli, E., Paoletta, L., Dalprà, L., and Tagliavini, F. (2013). Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy number variations widely in the genome. *J Alzheimers Dis* 33, 969–982.

Rossi, G., Dalprà, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F.L., Catania, M., Di Fede, G., Mangieri, M., Giaccone, G., Croci, D., et al. (2008). A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability. *Cell Cycle* 7, 1788–1794.

S

Sahara, N., DeTure, M., Ren, Y., Ebrahim, A.-S., Kang, D., Knight, J., Volbracht, C., Pedersen, J.T., Dickson, D.W., Yen, S.-H., et al. (2013). Characteristics of TBS-extractable hyperphosphorylated Tau species: aggregation intermediates in rTg4510 mouse brain. *J Alzheimers Dis* 33, 249–263.

Salib, E., and Hillier, V. (1997). Head injury and the risk of Alzheimer's disease: a case control study. *Int J Geriatr Psychiatry* 12, 363–368.

Santa-María, I., Hernández, F., Moreno, F.J., and Avila, J. (2007). Taurine, an inducer for tau polymerization and a weak inhibitor for amyloid-beta-peptide aggregation. *Neurosci. Lett.* 429, 91–94.

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, 476–481.

Sarkar M, Kuret J, Lee G. (2008) Two motifs within the tau microtubule-binding domain mediate its association with the hsc70 molecular chaperone. *J Neurosci Res.* 86(12):2763-73.

Sato, Y., Naito, Y., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Endo, T. (2001). Analysis of N-glycans of pathological tau: possible occurrence of aberrant processing of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Letters* 496, 152–160.

Schengrund, C.-L. (2010). Lipid rafts: Keys to neurodegeneration. *Brain Research Bulletin* 82, 7–17.

Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., and Buée, 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.

Schweers, O., Schönbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., and Mandelkow, E. (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no

evidence for beta-structure. *J. Biol. Chem.* 269, 24290–24297.

Selkoe (2001). Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. 1–7.

Sergeant, N., Delacourte, A., Buée, L. (2005) Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta.*;1739(2-3):179-97.

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

Sergeant, N., David, J.P., Lefranc, D., Vermersch, P., Watzet, A., and Delacourte, A. (1997). Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases. *FEBS Letters* 412, 578–582.

Sergeant, N., Sablonnière, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Muraige, C.A., Watzet, A., Vermersch, P., and Delacourte, A. (2001). Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Human Molecular Genetics* 10, 2143–2155.

Sergeant, N., Watzet, A., and Delacourte, A. (1999). Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms. *Journal of Neurochemistry* 72, 1243–1249.

Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., Toyoshima, Y., Hasegawa, M., and Hisanaga, S.-I. (2012). Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by tau phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 32, 2430–2441.

Shi, Y., Thomas, J.O. (1992) The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol.* 12(5):2186-92.

Simons, K., and Ehehalt, R. (2002). Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 110, 597–603.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31–39.

Sivanandam TM, Thakur MK. (2012) Traumatic brain injury: a risk factor for Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(5):1376-81. doi: 10.1016/j.

Sjöberg, M.K., Shestakova, E., Mansuroglu, Z., Maccioni, R.B., and Bonnefoy, E. (2006). Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization. *Journal of Cell Science* 119, 2025–2034.

Sluchanko, N.N., Gusev, N.B. (2011) Probable participation of 14-3-3 in tau protein oligomerization and aggregation. *J Alzheimers Dis.* 27(3):467-76.

Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., LEE, G., and Brandt, R. (1999). Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of Tauopathies.

Sontag, E., Nunbhakdi-Craig, V., LEE, G., Bloom, G.S., and Mumby, M.C. (1996). Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A. *Neuron* 17, 1201–1207.

Spillantini, M.G., and Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *The Lancet Neurology* 12, 609–622.

Spillantini, M.G., Bird, T.D., and Ghetti, B. (1998a). Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies. *Brain Pathol.* 8, 387–402.

Spillantini, M.G., Murrell, J.R., Goedert, M., Farlow, M.R., Klug, A., and Ghetti, B. (1998b). Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 95, 7737–7741.

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, 1598–1607.

Steiner, B., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Gustke, N., Meyer, H.E., Schmidt, B., Mieskes,

G., Söling, H.D., Drechsel, D., and Kirschner, M.W. (1990). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca²⁺-calmodulin dependent kinase and relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. *Embo J.* 9, 3539–3544.

Suberbielle, E., Sanchez, P.E., Kravitz, A.V., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., Devidze, N., Kreitzer, A.C., and Mucke, L. (2013). Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β . *Nat Neurosci* 16, 613–621.

Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Begard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., et al. (2011). Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection. *Journal of Biological Chemistry* 286, 4566–4575.

Sumpter, P.Q., Mann, D.M., Davies, C.A., Yates, P.O., Snowden, J.S., Neary, D. (1986) An ultrastructural analysis of the effects of accumulation of neurofibrillary tangle in pyramidal neurons of the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 12(3):305-19.

Sun, Q., and Gamblin, T.C. (2009). Pseudohyperphosphorylation causing AD-like changes in tau has significant effects on its polymerization. *Biochemistry* 48, 6002–6011.

T

Takuma, H., Arawaka, S., and Mori, H. (2003). Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 142, 121–127.

Tatebayashi, Y. (2004). Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 in the regulation of organelle transport. *Journal of Cell Science* 117, 1653–1663.

Thinakaran, G.G., and Koo, E.H.E. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J. Biol. Chem.* 283, 29615–29619.

Thurston, V.C., Pena, P., Pestell, R., and Binder, L.I. (1997). Nucleolar localization of the microtubule-associated protein tau in neuroblastomas using sense and anti-sense transfection strategies. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 100–110.

Tokuda, T.T., Ikeda, S.S., Yanagisawa, N.N., Ihara, Y.Y., and Glenner, G.G.G. (1990). Re-examination of ex-boxers' brains using immunohistochemistry with antibodies to amyloid beta-protein and tau protein. *Acta Neuropathol* 82, 280–285.

Tolnay, M., Sergeant, N., Ghestem, A., Chalbot, S., De Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Probst, A., Delacourte, A. (2002) Argyrophilic grain disease and Alzheimer's disease are distinguished by their different distribution of tau protein isoforms. *Acta Neuropathol.* 104(4):425-34.

Tranchant, C., Sergeant, N., Wattez, A., Mohr, M., Warter, J.M., Delacourte, A. (1997) Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 63(2):240-6.

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

Tysoe, C., Whittaker, J., Xuereb, J., Cairns, N.J., Cruts, M., Van Broeckhoven, C., Wilcock, G., and Rubinsztein, D.C. (1998). A presenilin-1 truncating mutation is present in two cases with autopsy-confirmed early-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 62, 70–76.

U

Utton, M.A., Noble, W.J., Hill, J.E., Anderton, B.H., and Hanger, D.P. (2005). Molecular motors implicated in the axonal transport of tau and alpha-synuclein. *Journal of Cell Science* 118, 4645–4654.

V

Valko, M.M., Leibfritz, D.D., Moncol, J.J., Cronin, M.T.D.M., Mazur, M.M., and Telser, J.J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 41–41.

Vega, I.E., Cui, L., Propst, J.A., Hutton, M.L., Lee, G., and Yen, S.-H. (2005). Increase in tau tyrosine phosphorylation correlates with the formation of tau aggregates. *Brain Res.*

Mol. Brain Res. 138, 135–144.

W

Wang, J., Markesbery, W.R., and Lovell, M.A. (2006). Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *Journal of Neurochemistry* 96, 825–832.

Wang, Y., Loomis, P.A., Zinkowski, R.P., and Binder, L.I. (1993). A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *The Journal of Cell Biology* 121, 257–267.

Ward, S.M., Himmelstein, D.S., Lancia, J.K., and Binder, L.I. (2012). Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 667–671.

Weaver, C.L.C., Espinoza, M.M., Kress, Y.Y., and Davies, P.P. (2000). Conformational change as one of the earliest alterations of tau in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 21, 719–727.

Wei, Y., Qu, M.-H., Wang, X.-S., Chen, L., Wang, D.-L., Liu, Y., Hua, Q., and He, R.-Q. (2008). Binding to the Minor Groove of the Double-Strand, Tau Protein Prevents DNA from Damage by Peroxidation. *PLoS ONE* 3, e2600.

Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.-Y., and Kirschner, A.M.W. (1975). A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol.72, pp.1858–pp.1862.

Williamson, R., Scales, T., Clark, B.R., Gibb, G., Reynolds, C.H., Kellie, S., Bird, I.N., Varndell, 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. *Journal of Neuroscience* 22, 10–20.

Wilson, D.M., and Binder, L.I. (1997). Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis

in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 150, 2181–2195.

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, 711–714.

Wojtowicz, J.M. (2012) Adult neurogenesis. From circuits to models. *Behav Brain Res.*;227(2):490-6.

Y

Yang, K., Belrose, J., Trepanier, C.H., Lei, G., Jackson, M.F., and MacDonald, J.F. (2011). Fyn, a potential target for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 27, 243–252.

Yoshida, H.H., Crowther, R.A.R., and Goedert, M.M. (2002). Functional effects of tau gene mutations deltaN296 and N296H. *Journal of Neurochemistry* 80, 548–551.

Yu G., Nishimura M., Arawaka S., Levitan D., Zhang L., Tandon A., Song Y. Q., Rogaeva E., Chen F., Kawarai T., Supala A., Levesque L., Yu H., Yang D. S., Holmes E., Milman P., Liang Y., Zhang D. M., Xu D. H., Sato C., Rogaev E., Smith M., Janus C., Zhang Y., Aebersold R., Farrer L. S., Sorbi S., Bruni A., Fraser P. et St George-Hyslop P. (2000). Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48-54.

Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., and Nixon, R.A. (2008). Axonal Transport Rates In Vivo Are Unaffected by Tau Deletion or Overexpression in Mice. *Journal of Neuroscience* 28, 1682–1687.

Z

Zarranz, J.J., Gómez-Esteban, J.C., Atarés, B., Lezcano, E., Forcadás, M. (2006) Tau-predominant-associated pathology in a sporadic late-onset Hallervorden-Spatz syndrome. *Mov Disord.* 21(1):107-11.

Zhou, X.Z., Kops, O., Werner, A., Lu, P.J., Shen, M., Stoller, G., Küllertz, G., Stark, M., Fischer, G., and Lu, K.P. (2000). Pin1-dependent prolyl isomerization regulates dephosphorylation of Cdc25C and tau proteins. *Molecular Cell* 6, 873–883.

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

Zola-Morgan, S., Squire, L.R., and Amaral, D.G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 6, 2950–2967.

Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Rempel, N.L., Clower, R.P., and Amaral, D.G. (1992). Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 12, 2582–2596.

ANNEXES

Ce travail a donné lieu aux communications suivantes :

Communications par affiche :

- **M. VIOLET**, L. DELATTRE, A. CHAUDERLIER, A. SULTAN, M. TARDIVEL, Z. MANSUROGLU, R. CAILLIEREZ, S. BÉCARD, S. TALAHARI, V. DERAMECOURT, F. NESSLANY, M. COLIN, B. LEFEBVRE, E. BONNEFOY, L. BUÉE, MC. GALAS « Early pathological phosphorylation promotes Tau oligomerization and DNA damage under stress condition in an AD-like Tau pathology mice model » Conférences Jacques Monod (Pathologies du méplieement des protéines : processus moléculaires et perspectives thérapeutiques), Roscoff, France, 13-17 Avril 2013.

- MC. GALAS, **M. VIOLET**, L. DELATTRE, A. SULTAN, M. TARDIVEL, R. CAILLAREZ, S. BÉCARD, S. TALAHARI, F. NESSLANY, M. COLIN, B. LEFEBVRE, E. BONNEFOY, L. BUÉE “Early pathological Tau phosphorylation promotes nucleic acid damage and chromatin remodelling in stress condition” Alzheimer's & Parkinson's Diseases Congress - AD/PD, Florence, Italie, 6-10 March, 2013.

- **M. VIOLET**, L. DELATTRE, M. CALDARA, V. FRANSSENS, V. DERAMECOURT, L. BUÉE, MC. GALAS, J. WINDERICKX “Characterisation of the association and phosphorylation state of Tau protein associated to lipid raft in healthy and AD brains” Alzheimer's & Parkinson's Diseases Congress - AD/PD, Florence, Italie, 6-10 March, 2013.

- **M. VIOLET**, A. SULTAN, L. DELATTRE, S. TALAHARI, F. NESSLANY, M. COLIN, E. BONNEFOY, L. BUÉE, MC. GALAS « Nuclear Tau : a key actor in Alzheimer's disease » journée des doctorants, avril 2011, Lille, France

Communications par orale:

- GALAS M.C., **VIOLET M.**, SULTAN A., DELATTRE L., MANSUROGLU Z., LOYENS A., TARDIVEL M., HUMEZ S., NESSLANY F., COLIN M., BONNEFOY E., BUEE L. « Tau : un nouveau rôle dans la protection de l'ADN neuronal »- 11ème réunion francophone et syndromes apparentés, mai 2012 Toulouse, France

- **VIOLET M.**, DELATTRE L., NESSLANY F., BEGARD S., COLIN M., BONNEFOY E., M.C. GALAS « Impact of Tau phosphorylation on its ability to protect neuronal DNA » Journée des doctorants, Avril 2012, Lille, France

- MOKRANI-BENHELLI H., **VIOLET M.**, SOUES S., DELATTRE L., BUEE L., GALAS M.C., BONNEFOY E « Nuclear Tau incultured neurons : a pericentromeric satellite DNA interaction disrupted after heat shock DNA damage » The 22th Wilhelm Bernhard Workshop, Aout 2011, Riga, Lettonie

- GALAS M.C., **VIOLET M.**, DELATTRE L., SULTAN A., TARDIVEL M., BEGARD S., CAILLAREZ R., TALAHARI S., DERAMECOURT V., MOKRANI H., NESSLANY F., BONNEFOY E., COLIN M. « Deleterious effect of Alzheimer disease like-Tau phosphorylation on its DNA protective function in stress condition. A cellular and in vivo study »- AAIC Alzheimer's Association International Conference. Juillet 2011, Paris, France BUEE L