



HAL
open science

Nouvelles fonctions de la protéine Tau dans le métabolisme des ARN

Mélissa Gilles

► **To cite this version:**

Mélissa Gilles. Nouvelles fonctions de la protéine Tau dans le métabolisme des ARN. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS054 . tel-03227181

HAL Id: tel-03227181

<https://theses.hal.science/tel-03227181>

Submitted on 17 May 2021

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 du Droit et de la Santé de Lille**

École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

THÈSE

Présentée par

GILLES Mélissa

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité : Neurosciences

**NOUVELLES FONCTIONS DE LA PROTÉINE TAU DANS
LE MÉTABOLISME DES ARN**

Soutenue publiquement le 13 Novembre 2018 devant le jury
composé de :

Mme le Dr. Marie-Laure PARMENTIER

M. le Dr. Cyril BOURGEOIS

Mme le Dr. Magalie LECOURTOIS

M. le Pr. Éric ADRIAENSSENS

Mme le Dr. Marie-Christine GALAS

M. le Dr. Bruno LEFEBVRE

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse

« La science est une histoire sans fin. La question n'est pas de savoir qui a raison, qui a tort. Le but est de progresser. (...) Les plus grands défis ne sont pas surmontés quand nos prédictions sont exactes, mais quand elles ne le sont pas ! Nous découvrons alors de nouvelles informations qui nous obligent à modifier tout ce que nous croyions savoir. »

Stephen Hawking ; *Astrophysicien, mathématicien, théoricien et cosmologiste (1942-2018)*

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le **Dr. Marie-Laure Parmentier**, le **Dr. Cyril Bourgeois**, le **Dr. Magalie Lecourtois**, le Pr. **Eric Adriaenssens**, le Dr. **Marie-Christine Galas** et le **Dr. Bruno Lefebvre** qui m'ont fait l'honneur d'être membres de mon jury de thèse. Je remercie particulièrement mes rapporteurs le **Dr. Marie-Laure Parmentier** et le **Dr. Cyril Bourgeois** pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon manuscrit.

Un merci particulier aux membres de mon comité de suivi de thèse : le **Dr. Fabrice Lejeune** et le Pr. **Eric Adriaenssens** pour leurs précieux conseils.

Je remercie également le **Dr. Luc Buée** pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe « Alzheimer et tauopathies » pendant mon master et ma thèse. Un grand merci pour vos nombreux conseils scientifiques toujours avisés et le temps que vous m'avez accordé malgré vos nombreuses responsabilités.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le **Dr. Bruno Lefebvre**, pour m'avoir accueillie au sein du petit groupe « Tau dans l'noyau ». Merci pour la grande confiance que vous m'avez accordée et de m'avoir laisser prendre des initiatives. Merci pour votre aide au quotidien, vos conseils et vos encouragements. Un grand merci également au **Dr. Marie-Christine Galas** pour la sympathie et la bienveillance dont vous m'avez toujours fait part. Vous avez largement participé au bon déroulement de mon projet de thèse.

Je tiens à remercier les docteurs **Morvane Colin**, **Valérie Buée-Scherrer**, **Malika Hamdame**, **Valérie Vingtdeux**, **Bernard Sablonnière**, **David Blum** et **Nicolas Sergeant** pour leur soutien et leurs remarques constructives lors des réunions. Un merci particulier à David pour les bonnes adresses culinaires de Strasbourg !

Je remercie les anciens du labo. **Meliza**, mon petit rayon de soleil, toujours souriante et bienveillante qui m'a fait un super accueil à mon arrivée au labo. Je garderai en souvenir nos petites sessions de customisation des « Western drama » ! **Simon** et **Maxime**, le duo infernal ! Merci pour votre bonne humeur et vos petites blagues (pas

toujours très drôles). Un grand merci à **Anthony**, alias toto, pour m'avoir soutenue durant l'année du master. Pourquoi j'ai en tête une fameuse chanson de notre ami Sébastien Patoche lorsque j'écris ces quelques lignes ? Je remercie chaleureusement **Dominique**, la maman du labo, qui s'est toujours très bien occupée de nous. Merci à **Coline**. Je dois avouer que je n'ai jamais entendu quelqu'un rouler les « R » aussi bien que toi ! « Que c'est crevant de voir crever... » Et bien non, je ne m'en rappelle toujours pas ! Je remercie également les post-doc **Lucrezia**, **Claudia** et **Frank**. Merci à **Delphine** et **Charlotte** avec qui j'ai partagé de bons moments. J'espère qu'on se fera d'autres soirées raclettes ! Merci à **Alexandre** pour tes blagues à deux balles et ta joie de vivre communicative. Je remercie également **Marie-Line** pour ta gentillesse et le soutien que tu m'as apporté. Enfin, je remercie **Alban**, pour m'avoir formée aux différentes techniques toujours dans la bonne humeur et pour ton aide indéfectible. Tu es une personne sur qui on peut compter ! Je te souhaite beaucoup de bonnes choses pour ta nouvelle vie à Lyon !

Claire, un grand merci à toi. Nos petites (je devrais dire graaaaaande) discussions du soir au labo vont me manquer ! Je suis certaine qu'on en aura encore beaucoup d'autres mais ça sera autour d'un verre (de coca bien sûr) ou entre deux séances de footing ! Je garderai en souvenir tes entrées fracassantes dans mon bureau, tes « j'ai un truc à te diiiiiiiiiire », nos sessions randorollers et nos supers missions pour élucider les mystères du labo. Plus sérieusement, j'ai passé de super moments à tes côtés, ça n'aurait pas été aussi fun si tu n'avais pas été là ! En parlant de personne fun, un grand merci à ma petite belge **Marie**. Sous ton tempérament de feu, tu es une personne qui a le cœur sur la main. J'ai été plus que ravie de partager mon bureau avec toi. Plus qu'un bureau, on a partagé nos trois années de thèse ensemble et ce n'est pas rien. Dans les bons comme dans les mauvais moments tu m'as toujours soutenue. J'ai une entière confiance en toi et plus qu'une collègue, je pense avoir trouvé une amie (et une cuisinière attirée aussi :p). Bon courage pour ta dernière ligne droite, je suis sûre que tu vas tout déchirer. **Florian**, je te remercie pour tes petites sessions énigmes dont toi seul à le secret (j'espère qu'un jour tu résoudras le problème de ton câble jaune). Merci à **Caroline**. Comment dirais-je ? Toi seule comprends ce que c'est de trébucher 3 fois par jour et d'écouter des musiques douteuses pendant la rédaction ! (Comment il s'appelle ??). Un merci particulier à **Mégane**, alias My frrrriend, ma livreuse de tarte aux pommes préférée :p (ou de jus de pruneau...). C'était vraiment chouette à

Strasbourg avec **Clément** ! Merci à ma petite **Sarah L**, toujours gentille et à l'écoute. Merci à toi **Théo**, pour tes blagues graveleuses qui tombent toujours à pique ! (même si shame on you pour ton changement de bureau). Un grand merci également à **Sarah G**, **Kevin** et **Thomas R** (bon courage pour votre thèse, vous êtes bien parties !). Merci à **Victoria**, nos séances de Zumba étaient fortes sympathiques ! Merci à **Manon** ma partenaire de M2 avec qui je garde de bons souvenirs de Roscoff.

Un grand merci à l'ensemble des ITA, **Sahiba**, **Raphaëlle**, **Séverine** et **Sébastien**. Merci pour le travail que vous faites et de nous rendre la vie plus facile au sein du labo. Un merci particulier à **Seb**, tes filles ont un super papa ! Et désolée de ne pas être allée au RU plus souvent ! Je n'oublie pas de remercier également **Anna**, **Mathilde**, **Espérance**, **Catherine**, **Émilie** (bon courage pour ton concours), **Céline**, **Sophie**, **Vincent**, **Hamza**, **Ouada** et **Thomas C**. Un grand merci aux secrétaires qui veillent au bon déroulement de notre quotidien et font un travail remarquable, **Céline Brand**, **Sophie Lesage**, **Michèle Revez** et **Natalie Perrais**. Merci aussi à **Charlotte** et **Maximilien** nos responsables communication. Merci beaucoup à **Karim** et surtout à **Thomas** qui fait un travail de titan, toujours avec le sourire, et sans qui le labo ne fonctionnerait pas correctement.

Je remercie également ceux qui me sont chers, ma famille. Merci à toi **papa** pour ton soutien et toute l'aide que tu m'as apportée au cours de ces longues années d'études. Je te dois beaucoup ! Merci à mes sœurs et frères. **Mélanie**, ma grande sœur, qui a toujours été là pour moi et merci à **Nico**, mon frère de cœur. **Tiffany** et **Titi** (chonchon pour les intimes), merci pour ces moments de détente et fous rires partagés. Merci aux petits monstres que j'ai vu grandir (**Milenko**, **Tatiana**, **Mathis**, **Layna** et **Saubane**), mes bouffées d'oxygènes. **Héloïse**, je ne vous oublie pas ! Merci pour la relecture ! Et enfin, un grand merci à **Yanis**, pour la personne extraordinaire que tu es, pour tes encouragements et ton soutien à toute épreuve. Merci du fond du cœur.

Je remercie également la région Hauts-de-France ainsi que le CHU de Lille pour avoir financé ma thèse.

Résumé

Les tauopathies regroupent un ensemble de maladies neurodégénératives caractérisées par une agrégation intra-neuronale des protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées. L'accumulation de ces lésions altère l'activité neuronale conduisant, à terme, à la mort des cellules. Bien qu'il ait été déterminé que Tau joue un rôle central dans le développement de ces pathologies, il reste encore de nombreuses zones d'ombre concernant la compréhension de son activité physiologique. La protéine Tau a été initialement décrite comme régulant la dynamique des microtubules au sein des neurones. Cependant, de nombreuses études ont démontré que Tau n'est finalement pas qu'une simple MAP (*microtubule associated proteins*), mais une protéine pléiotropique impliquée dans de nombreux mécanismes selon sa localisation cellulaire. Au niveau cytoplasmique, la protéine Tau régule notamment le transport axonal et le trafic d'organites, la croissance neuritique ou encore la transmission synaptique. Tau est également présente au niveau nucléaire où elle participe à la protection des acides nucléiques, au maintien de l'hétérochromatine péricentromérique et à la régulation de l'expression des gènes ribosomiaux. Récemment, plusieurs travaux ont identifié une interaction entre Tau et diverses protéines impliquées dans le métabolisme des ARN. De manière intéressante, des altérations du métabolisme des acides nucléiques ont été observées chez les patients atteints de tauopathies. Ces données permettent de suggérer que Tau puisse également être impliquée dans ces mécanismes.

Afin de déterminer le possible rôle de Tau dans le métabolisme des ARN, nous avons effectué une recherche de nouveaux partenaires protéiques de Tau par une approche de tandem affinity purification (TAP) couplée à de la spectrométrie de masse. L'ARN hélicase à boîte DEAD DDX5 a été identifiée grâce à cette technique. DDX5 est une protéine impliquée dans de nombreux mécanismes régulant le métabolisme des ARN tels que la transcription, l'épissage, la biogénèse des micro ARN et des ARN ribosomiaux ou encore la dégradation des ARNm par la voie NMD (*nonsense mediated-mRNA decay*).

Au cours de cette étude nous avons validé l'interaction entre Tau et DDX5 par différentes méthodes *in vitro* et *in cellulo*. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons démontré la présence de DDX17, une autre ARN hélicase à boîte DEAD, dans ce complexe et mis en évidence que cette interaction est régulée par la présence d'ARN. Nous avons identifié les séquences de Tau impliquées dans l'interaction avec DDX5 et révélé qu'elles se trouvent au niveau de son domaine riche en proline. L'utilisation de systèmes rapporteurs nous a permis de démontrer que Tau régule positivement la dégradation des ARNm par la voie NMD de façon DDX5 dépendante. Nos résultats révèlent également que Tau régule négativement l'épissage des pré-ARNm et contrôle l'expression des facteurs d'épissage PTBP1 et PTBP2. De façon intéressante, il est connu que le NMD peut contrôler l'expression de protéines impliquées dans l'épissage par le système « *Alternative splicing coupled to NMD* » (AS-NMD) suggérant que l'effet de Tau dans l'épissage, observé dans nos résultats, puisse dépendre de l'activation de la voie NMD en amont. L'utilisation du mutant pathologique Tau P301S et de mutants phosphomimétiques nous a permis de mettre en évidence que la régulation de Tau dans la voie NMD dépend de son état de phosphorylation notamment au niveau de la thréonine 231, un site localisé au niveau de son domaine riche en proline connu pour être phosphorylé dans les tauopathies.

Ces résultats révèlent de nouvelles fonctions de Tau dans le métabolisme des ARN et suggèrent un impact de la pathologie Tau dans la régulation de la voie NMD.

Abstract

Tauopathies are neurodegenerative diseases characterized by an intraneuronal aggregation of hyperphosphorylated Tau proteins. The accumulation of these lesions induces neuronal dysfunctions leading to cells death. It has been established that Tau dysfunctions play a central role to the neurodegenerative process. However, the physiological functions of these proteins are still incompletely understood. Tau was first described as a microtubule associated protein involved in microtubule stabilization. However, it has been shown that Tau displays additional functions depending of its cellular localization. In the cytoplasm, Tau regulates axonal transport, synaptic functions and signaling pathway. Tau was found also in the nuclear compartment where it is involved in nucleic acid protection, organization of neuronal pericentromeric heterochromatin and expression of ribosomal genes. In addition, studies have demonstrated an interaction between Tau and several RNA binding proteins, known to play a role in RNA metabolism. Moreover, dysfunctions of this mechanism have been reported in tauopathies.

To gain insights into roles of Tau in RNA metabolism, we used tandem affinity purification coupled to mass spectrometry to identify novel interaction partners. We identified DDX5, a DEAD box RNA helicase, as a novel interacting partner. DDX5 is a protein involved in several RNA metabolic processes such as, transcription, splicing, ribosome and micro RNA biogenesis and nonsense mediated mRNA decay (NMD). In this work, we validated Tau-DDX5 interaction and identified the Tau sequence involved in the interaction. We also showed that this interaction is modulated in a RNA dependent manner and identified the presence of DDX17, another DEAD box RNA helicase, in this complex. Our results demonstrated that Tau positively regulates mRNA degradation by NMD pathway in a DDX5 dependent manner. We also shown that Tau negatively regulates pre-mRNA splicing and expression of splicing factors PTBP1 and PTBP2. The NMD is known to modulate expression of some splicing factors through a system called "Alternative splicing coupled to NMD" (AS-NMD) suggesting that Tau effect on splicing could be dependent of NMD activation. Interestingly, Tau phosphorylation, especially the threonine 231 known to be involved in tauopathies, increased the effect of Tau on NMD pathway.

Altogether, our results highlight a link between Tau and the DEAD box RNA helicase DDX5 and demonstrate an unexpected role of Tau in regulating splicing and NMD pathway. Our findings suggest that a loss of Tau functions may participate directly to the splicing and NMD target genes misregulation observed in tauopathies.

Liste des figures

Introduction

Figure 1 : Représentation schématique de l'épissage alternatif du transcrit de Tau dans le système nerveux central

Figure 2 : Représentation schématique des différents domaines de Tau

Figure 3 : Interaction de Tau aux microtubules

Figure 4 : Les fonctions de Tau nucléaire

Figure 5 : Schéma récapitulatif des différentes fonctions physiologiques des protéines Tau

Figure 6 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de Tau

Figure 7 : La phosphorylation de Tau régule la polymérisation des microtubules

Figure 8 : Caractéristiques des agrégats Tau

Figure 9 : Le « code barre » des tauopathies

Figure 10 : Les Mutations du gène MAPT

Figure 11 : Atrophie du cerveau chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer

Figure 12 : Lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer

Figure 13 : Représentation schématique du métabolisme de l'APP

Figure 14 : Propagation progressive et hiérarchisée de la dégénérescence neurofibrillaire

Figure 15 : Modèle d'agrégation des protéines Tau

Figure 16 : Représentation schématique des sites de phosphorylation pathologiques des protéines Tau

Figure 17 : Schéma récapitulatif des fonctions de Tau altérées au cours des tauopathies

Figure 18 : Cladogramme des superfamilles SF1 et SF2

Figure 19 : Représentation schématique des différents motifs des hélicases à boîte DEAD

Figure 20 : Conservation des domaines constituant les ARN hélicases DDX5 et DDX17

Figure 21 : Représentation simplifiée de l'exclusion d'un intron et de la ligation de deux exons adjacents lors de l'épissage

Figure 22 : Les conséquences de l'épissage alternatif

Figure 23 : Reconnaissance d'un codon stop prématuré

Figure 24 : Représentation schématique du premier tour de traduction

Figure 25 : Représentation schématique des différentes étapes activant la voie NMD

Figure 26 : Représentation schématique de la dégradation des ARNm par la voie NMD

Figure 27 : Le NMD, un contrôle qualité des ARNm et un mécanisme régulant l'expression de gènes physiologiques

Figure 28 : L'expression de PTB est régulée par la voie NMD

RESULTATS

Figure 1 : Tau interagit avec DDX5 et DDX17

Figure 2 : L'interaction Tau-DDX5 est ARN-dépendante

Figure 3 : L'interaction Tau-DDX5 est régulée par l'ARN long non codant SRA

Figure 4 : Domaine minimal d'interaction entre Tau et DDX5

Figure 5 : Les lysines K224, K225 et K234 sont impliquées dans l'interaction Tau-DDX5

Figure 6 : Étude de l'implication de Tau dans la transcription

Figure 7 : Étude de l'implication indirecte de Tau dans la transcription

Figure 8 : Tau régule négativement l'épissage

Figure 9 : Tau régule positivement la voie NMD

Figure 10 : La régulation du NMD par la protéine Tau dépend de l'expression de DDX5

Figure 11 : La régulation de Tau sur le NMD dépend de l'ARN long non codant SRA

Figure 12 : Tau interagit avec CBP80

Figure 13 : La mutation P301S renforce l'effet de Tau sur le NMD

Figure 14 : Les mutations P301S et P301L ne modifient pas l'interaction entre Tau et DDX5

Figure 15 : La mutation P301S augmente le niveau de phosphorylation de Tau au niveau de son domaine riche en proline

Figure 16 : Les mutants P301S et P301L ne modulent pas le niveau de phosphorylation de Tau au niveau des résidus sérine 202 et thréonine 205

Figure 17 : Le niveau de phosphorylation de Tau ne module pas son interaction avec DDX5 *in vitro*

Figure 18 : La phosphorylation de la thréonine 231 module l'effet de Tau dans la régulation du NMD

Figure 19 : Le mutant P301S de Tau régule négativement l'expression des facteurs d'épissage PTBP1 et PTBP2

Figure 20 : Accumulation de DDX5 dans le cytoplasme des neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer

DISCUSSION

Figure 1 : Activation du NMD par les protéines Tau

Figure 2 : Régulation de l'épissage par Tau via le système AS-NMD

Figure 3 : Schéma explicatif de notre deuxième hypothèse concernant l'effet de la phosphorylation de Tau sur son interaction avec DDX5

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Figure 1 : Expression des hélicases DDX5 et DDX17 au cours de la différenciation neuronale

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des différentes tauopathies

Tableau 2 : Fonctions de DDX5 et DDX17 dans la régulation de la transcription

Tableau 3 : Récapitulatif des anticorps utilisés au cours de cette étude

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AEP :	Asparagine Endopeptidase
AICD :	APP intracellular domain
APOE :	Apolipoprotéine E
APP :	Amyloid precursor protein
ARN :	Acide ribonucléique
ATF3 :	Activating transcription factor 3
ATP :	Adénosine triphosphoate
BDNF :	Brain-derived neurotrophic factor
BIN1 :	Bridging integrator 1
cAMP :	Cyclic adenosine monophosphate
CBP80 :	Cap-Binding Complex 80-kDa protein
CDK5 :	Cyclin-dependent-like kinase 5
DECID :	Decay inducing complex
DDX5 :	DEAD box protein 5
DDX6 :	DEAD box protein 6
DDX17 :	DEAD box protein 17
DMPK :	Dystrophy myotonic protein kinase
DNF :	Dégénérescence neurofibrillaire
eIF4E :	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EJC :	Exon junction complex
eRF1-3 :	Eucaryotic release factor 1-3
FRET :	Fluorescence resonance Energy Transfert
FTD :	Démence fronto-temporale
FTDP-17 :	Démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17
GADD45 :	Growth arrest and DNA damage 45
GSK3beta :	Glycogen synthase kinase 3beta
GST :	Glutathione S-transferase
HAT :	Histone acetyl-transferase
HDAC :	Histone deacetylase
hnRNP :	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
KO :	Knockout
MA :	Maladie d'Alzheimer
MAP :	Microtubule associated protein
MAPT :	Microtubule associated protein Tau
MBNL1 :	Musclebind like splicing regulator 1
MBP :	Myelin basic protein

NES :	Nuclear export sequence
NLS :	Nuclear localization sequence
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
NMD :	Nonsense mediated mRNA decay
NOVA :	Neuro-oncological ventral antigen
nPTB :	Neural polyrimidine tract binding protein
PHF :	Paired Helicoidal fibrils
PLA :	Proximity ligation assay
PP1 :	Protein phosphatase 1
PP2A :	Protein phosphatase 2A
PRD :	Proline rich domain
PRF :	Programmed ribosomal frameshifting
PSD 95 :	Postsynaptic density protein 95
PTB :	Polyrimidine tract binding protein
PTC :	Premature termination codon
REST :	RE1-silencing transcription factor
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SC35 :	Spliceosome component of 35 kDa
shRNA :	Small hairpin RNA
siRNA :	Small interferent RNA
SMG :	Suppresor with morphological effect on genitalia
SRA :	Steroid receptor mRNA activator
SR :	Serine-arginine rich
TAP :	Tandem affinity purification
uORF :	Upstream open reading frame
Upf :	Upframeshift
UTR :	Untranslated region

Table des matières

INTRODUCTION	24
CHAPITRE 1 : LA PROTEINE TAU	23
I. <i>Structure de la protéine Tau</i>	23
1. Du gène à la protéine.....	23
2. Localisation.....	25
3. Structure de la protéine Tau	25
3.1 Structure primaire	25
3.2 Étude conformationnelle.....	27
II. <i>Tau, une protéine dites « pléiotropique »</i>	27
1. Tau et la stabilisation des microtubules	28
2. Tau et le transport axonal.....	29
3. Le rôle de Tau dans la croissance neuritique	30
4. Le rôle de Tau dans la signalisation cellulaire	31
4.1 Tau et la plasticité synaptique.....	31
4.2 Tau et la réponse à l'insuline.....	31
5. Les fonctions de Tau au niveau nucléaire	32
5.1 <i>Tau est présente au niveau du nucléole</i>	32
5.2 <i>Les différents rôles de Tau au niveau de l'ADN</i>	33
5.2.1 Un lien étroit entre Tau et la chromatine	33
5.2.2 Tau une protéine régulatrice de la transcription ?.....	34
5.2.3 Rôle protecteur de Tau envers les acides nucléiques.....	34
5.3 <i>Tau et le métabolisme des ARN</i>	36
III. <i>Les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau</i>	39
1. Tau, une protéine phosphorylée	39
2. Les autres modifications post-traductionnelles de Tau	40
2.1 L'acétylation des protéines Tau.....	40
2.2 La O-glycosylation des protéines Tau	41
2.3 La sumoylation des protéines Tau	41
IV. <i>Le rôle de la phosphorylation de Tau dans la régulation de ses fonctions physiologiques</i>	42
1. Phosphorylation de Tau et stabilité des microtubules	42
2. Phosphorylation de Tau et interaction avec ses partenaires	43
3. Phosphorylation de Tau, activité nucléaire et localisation subcellulaire.....	44
V. <i>D'autres modifications post-traductionnelles régulent l'activité de Tau</i>	45
CHAPITRE 2 : LA PROTEINE TAU ET LES MALADIES NEURODEGENERATIVES	46
I. <i>Les tauopathies, des maladies hétérogènes</i>	47
1. Des caractéristiques histologiques variées	47
2. Classification biochimique des tauopathies	48
3. Les causes des tauopathies	49
3.1 Les origines génétiques des tauopathies	49
3.1.1 Les mutations du gène MAPT	49
3.1.2 L'influence des haplotypes.....	51
3.1.3 D'autres altérations génétiques à l'origine des tauopathies.....	52
3.2 Les origines sporadiques des tauopathies	52
II. <i>La maladie d'Alzheimer, une tauopathie pas comme les autres</i>	53
1. Quelques dates historiques.....	53
2. Aspect clinique.....	53
3. Aspect neuropathologique.....	54
4. Aspect histologique.....	55
4.1 Les dépôts amyloïdes.....	55
4.2 Les dégénérescences neurofibrillaires	57

III. Les mécanismes d'agrégation de la protéine Tau.....	59
1. Comment s'agrègent les protéines Tau ?	59
2. Pourquoi les protéines Tau s'agrègent ?	61
2.1 Implication de la phosphorylation de Tau	61
2.2 Les autres modifications post-traductionnelles.....	63
2.2.1 L'acétylation de Tau dans les tauopathies.....	63
2.2.2 La troncation de Tau dans les tauopathies.....	64
IV. Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la pathologie Tau ?.....	65
1. Gain de fonction toxique de Tau.....	65
1.1 Impact des formes toxiques dans les mécanismes régulés par Tau	66
1.2 Dysfonctionnement du métabolisme des ARN.....	66
2. Une perte de fonction de Tau	67
CHAPITRE 3 : L'ARN HELICASE DDX5	69
I. Quelques généralités sur les ARN hélicases à boîte DEAD	69
1. Remodelage des acides nucléiques par les ARN hélicases à boîte DEAD.....	70
2. Structure des ARN hélicases à boîte DEAD	71
2.1 Les motifs impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP	71
2.2 Les autres motifs.....	71
2.3 Les extrémités terminales	72
II. Généralité sur DDX5 et son partenaire : l'ARN hélicase DDX17	72
1. Structure et localisation.....	72
III. Fonctions moléculaires de DDX5 et DDX17	74
1. Implication de DDX5 et DDX17 dans la régulation de la transcription	74
1.1 Mécanismes moléculaires.....	74
1.2 DDX5 et DDX17 des co-régulateurs des facteurs de transcription	75
2. Rôle de DDX5 et DDX17 dans la régulation de l'épissage	77
2.1 L'épissage, une étape majeure dans l'expression d'un gène	77
2.1.1 De l'expression à la maturation de l'ARN pré-messager	77
2.1.2 L'épissage : un mécanisme complexe	78
2.1.3 La régulation de l'épissage	79
2.1.4 Les Conséquences de l'épissage alternatif	80
2.2 DDX5 et DDX17 : Des facteurs clés dans la régulation de l'épissage.....	82
3. DDX5 un nouveau régulateur du NMD.....	83
3.1 Le mécanisme du NMD.....	83
3.1.1 Les protéines régulatrices du NMD.....	83
3.1.1.1 Les protéines Upf.....	83
3.1.1.2 Les protéines SMG	85
3.1.2 Les mécanismes d'activation du NMD.....	86
3.1.3 Les différentes étapes du NMD	87
3.1.3.1 Un mécanisme co-traductionnel	87
3.1.3.2 La formation du complexe DECID.....	89
3.1.4 Rôle physiologique du NMD.....	94
3.1.4.1 Comment se forme un codon stop prématuré ?	94
3.1.4.2 Les substrats physiologiques	94
3.1.4.3 L'épissage alternatif couplé au NMD.....	98
3.1.5 Implication de DDX5 dans l'activation du NMD.....	100
3.1.5.1 Les autres ARN hélicases impliquées dans le NMD	101
CHAPITRE 4 : ALTERATIONS DE DDX5 ET DU METABOLISME DES ARN DANS LES MALADIES	
NEURODEGENERATIVES	102
I. DDX5 et les tauopathies	102
II. Altération de l'épissage dans les maladies neurodégénératives	103
III. Altération du NMD dans les maladies neurodégénératives.....	103
PARTIE 1	105

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	106
MATÉRIELS ET MÉTHODES	109
I. <i>Culture cellulaire.....</i>	110
1. Les lignées cellulaires	110
2. Entretien des cellules.....	110
II. <i>Transfection transitoire, siRNA et mesure des activités luciférase et β-galactosidase</i>	110
III. <i>Mutagenèse dirigée</i>	112
IV. <i>GST-pulldown.....</i>	113
V. <i>Phosphorylation in vitro.....</i>	114
VI. <i>Streptavidine-pulldown.....</i>	114
VII. <i>Immunofluorescence</i>	115
1. Immunofluorescence sur coupes cérébrales en paraffine	115
2. Immunocytochimie	116
3. Proximity Ligation Assay (PLA, Duolink)	117
VIII. <i>Préparation des ARN et qPCR en temps réel.....</i>	117
IX. <i>Analyse biochimique.....</i>	118
1. Electrophorèse monodimensionnelle.....	118
2. Western blot	118
X. <i>Analyses statistiques.....</i>	120
RÉSULTATS	122
I. <i>Validation de l'interaction Tau-DDX5.....</i>	123
1. Tau interagit avec DDX5 et DDX17.....	123
2. L'interaction Tau-DDX5 est ARN dépendante.....	125
3. Implication de l'ARN long non codant SRA dans l'interaction Tau-DDX5.....	126
II. <i>Caractérisation de l'interaction Tau-DDX5.....</i>	128
1. Motif minimal d'interaction entre Tau et DDX5	128
2. Recherche d'acides aminés impliqués dans l'interaction Tau-DDX5.....	129
III. <i>Caractérisation fonctionnelle de l'interaction Tau-DDX5.....</i>	130
1. Étude des protéines Tau dans la transcription.....	130
2. La protéine Tau régule négativement l'épissage des ARN	132
3. La protéine Tau régule positivement la dégradation des ARN par la voie NMD	135
3.1 Le rôle de Tau dans la régulation de la voie NMD est modulée par DDX5.....	137
3.2 L'activité de Tau sur la voie NMD est régulée par SRA.....	138
3.3 Tau interagit avec CBP80, une protéine régulatrice du NMD.....	139
IV. <i>Étude du complexe Tau-DDX5 dans les tauopathies.....</i>	140
1. La mutation P301S renforce la régulation positive de Tau sur le NMD	140
2. P301S et P301L ne modifient pas l'interaction entre Tau et DDX5 in vitro.....	142
3. La mutation P301S modifie le niveau de phosphorylation de Tau au niveau des thréonines 231 et 235.....	142
4. La phosphorylation générale de Tau ne module pas son interaction avec DDX5 in vitro ...	146
5. La phosphorylation de Tau sur la thréonine 231 régule son effet sur la voie NMD	147
6. Recherche de gènes cibles régulés par Tau.....	149
7. Accumulation de DDX5 dans le cytoplasme de neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.....	151
DISCUSSION.....	153
I. <i>DDX5 et DDX17, des nouveaux partenaires des protéines Tau.....</i>	154
II. <i>Les ARN, des acteurs clés dans la régulation de l'interaction Tau-DDX5</i>	154
III. <i>Par quel(s) mécanisme(s) Tau régule la dégradation des ARNm par la voie NMD ?</i>	156
IV. <i>Quel est le lien entre Tau et l'épissage ?.....</i>	160
V. <i>La mutation P301S régule l'activité de Tau dans le métabolisme des ARN.....</i>	161
VI. <i>La phosphorylation de Tau régule son activité dans la voie NMD</i>	162

VII. <i>Le complexe Tau-DDX5 en condition pathologique</i>	163
CONCLUSION – PERSPECTIVES	165
I. <i>Déterminer les ARN non codants régulant l'interaction Tau-DDX5</i>	166
II. <i>Quels sont les sites de phosphorylation modulant l'activité du complexe Tau-DDX5 ?</i>	166
III. <i>Déterminer si l'effet de Tau dans l'épissage est NMD-dépendant</i>	167
IV. <i>Le complexe Tau-DDX5 dans les tauopathies</i>	167
1. <i>Études à partir de tissus humains</i>	167
2. <i>Études à partir de modèles murins</i>	168
V. <i>L'activation de la voie NMD par le complexe Tau-DDX5 régule la différenciation cellulaire ?</i> ...	168
PARTIE 2	171
I. <i>Introduction</i>	172
II. <i>Résultats</i>	172
III. <i>Discussion</i>	201
CONCLUSION GÉNÉRALE	203
BIBLIOGRAPHIE	206

INTRODUCTION

Chapitre 1 : La protéine Tau

La protéine Tau a été identifiée pour la première fois en 1975. Elle fut décrite comme étant un facteur impliqué dans l'assemblage des dimères de tubuline favorisant la polymérisation des microtubules *in vitro* (Weingarten *et al.*, 1975).

Au cours de ce chapitre nous nous intéresserons à la protéine Tau, plus particulièrement à sa structure et à ses différentes fonctions physiologiques, connues pour être régulées par l'ajout de modifications post-traductionnelles.

I. Structure de la protéine Tau

1. Du gène à la protéine

Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (*Microtubules-Associated Protein* ou MAP) et dérive d'un gène unique, le gène MAPT localisé sur le chromosome 17 en position 17q21 (Neve *et al.*, 1986). Le transcrit primaire est composé de 16 exons (Andreadis, Brown and Kosik, 1992; Caillet-Boudin *et al.*, 2015). On retrouve les exons E1, E4, E5, E7, E9, E11, E12 et E13 connus pour être constitutifs et les exons E2, E3, E6 et E10 soumis à l'épissage alternatif. L'exon 0 est associé aux régions promotrices du gène et n'est pas traduit, tout comme l'exon 14 qui est localisé dans la région 3' non traduite de l'ARNm de Tau. Les exons 4a et 8 sont systématiquement exclus dans le cerveau bien que l'exon 4a puisse être présent au niveau du système nerveux périphérique donnant naissance à une protéine Tau de haut poids moléculaire (Georgieff *et al.*, 1993; Park, Ahn and Gallo, 2016). L'exon 6 peut être détecté, de façon minoritaire, formant une protéine Tau tronquée au niveau de son domaine C-terminal (Luo *et al.*, 2004). Il est important de noter que l'exon 3 n'apparaît jamais indépendamment de l'exon 2. Ainsi, le cerveau humain adulte présente principalement 6 isoformes différentes de la protéine Tau (2-3-10-, 2+3-10-, 2+3+10-, 2-3-10+, 2+3-10+, 2+3+10+). Ces isoformes ont une nomenclature qui leur est propre. En effet, l'exclusion ou l'inclusion des exons 2 et 3 entraîne la production des isoformes appelées 0N, 1N ou 2N (N représentant le nombre d'inserts N-terminaux), tandis que l'exclusion ou l'inclusion de l'exon 10 conduit aux isoformes

appelées respectivement 3R ou 4R (R représentant le nombre de motifs répétés permettant la liaison aux microtubules) (Figure 1).

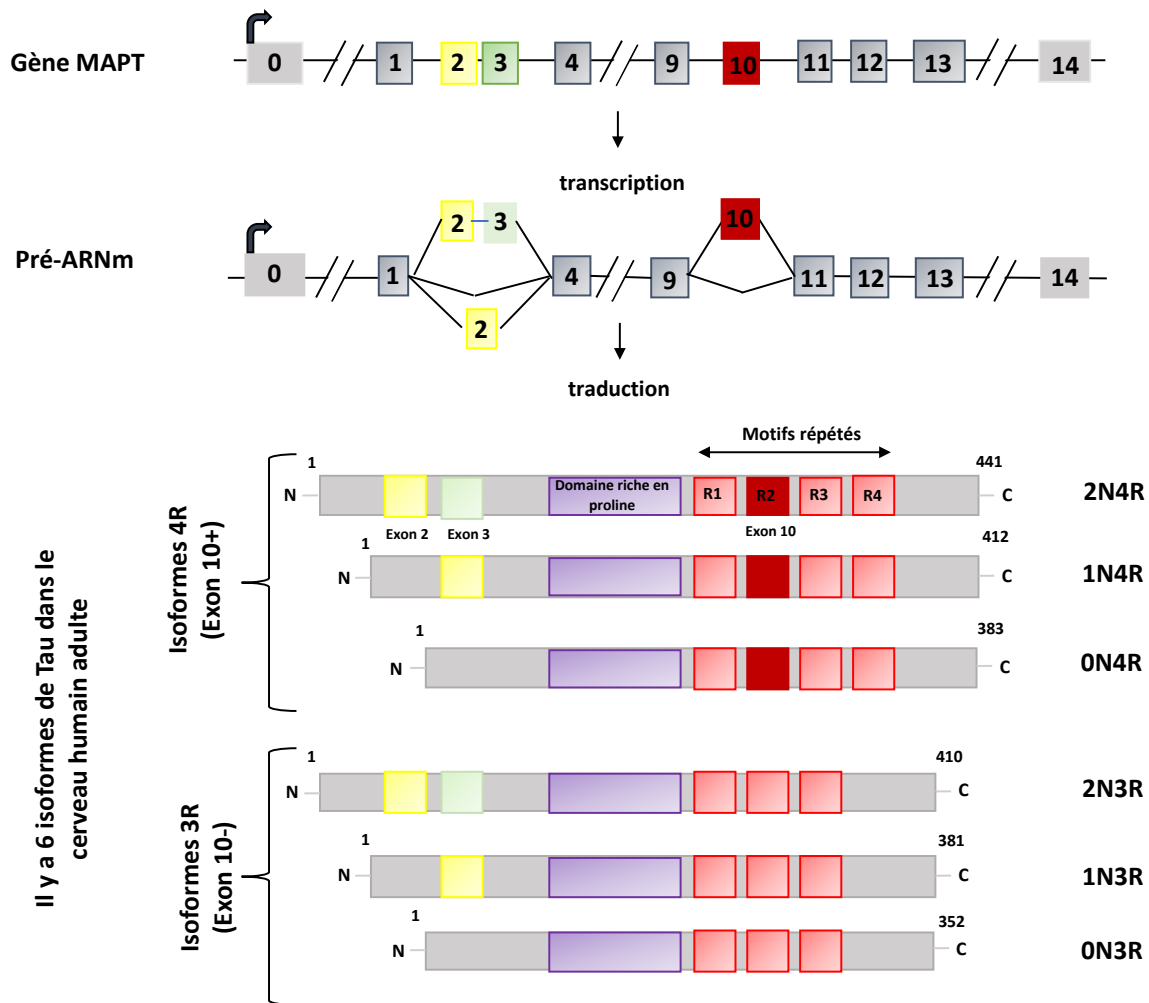


Figure 1 : Représentation schématique de l'épissage alternatif du transcrit Tau dans le système nerveux central. Le gène codant pour Tau, appelé MAPT, est situé sur le chromosome 17 en position 17q21. Les exons 2, 3 et 10 sont soumis à l'épissage alternatif donnant 6 isoformes différentes de Tau dans le cerveau humain adulte. La présence de l'exon 3 dépend de celle de l'exon 2. L'isoforme la plus longue est composée de 441 acides aminés (2N4R) tandis que l'isoforme la plus courte, encore appelée isoforme foetale, est constituée de 352 acides aminés (0N3R). *Modifié d'après (Buée et al., 2000).*

L'expression de la protéine Tau est régulée au cours du développement. Au stade foetal, seule l'isoforme la plus courte est exprimée (0N3R) tandis que les autres isoformes apparaissent au cours du développement. On dénombre six isoformes, exprimées en quantités différentes, dans le cerveau humain adulte (Andreadis et al., 2005). Les isoformes 2N sont minoritaires, elles totalisent 9 % des transcrits tau dans le système nerveux central tandis que les isoformes 0N et 1N représentent

respectivement 37% et 54% des transcrits. Les isoformes 3R et 4R sont quant à elles présentes en quantités similaires dans le cortex cérébral adulte sain (Goedert and Jakes, 1990).

2. Localisation

L'analyse de l'expression de Tau révèle que sa distribution varie en fonction des différentes régions cérébrales (Goedert *et al.*, 1989). En effet, le niveau d'ARNm et de protéine Tau est plus important au niveau du néocortex qu'au niveau du cervelet. L'épissage du pré-ARNm diffère également selon les régions étudiées. Par exemple, l'isoforme 0N3R est faiblement exprimée dans le cervelet par rapport aux autres régions cérébrales (Boutajangout *et al.*, 2004) tandis que, chez la souris, les isoformes 1N sont plus fortement exprimées dans la glande pituitaire que dans le cortex (Liu and Götz, 2013). Ces résultats pourraient expliquer, du moins en partie, les différences de vulnérabilité des différentes régions cérébrales face à l'expansion de la pathologie Tau.

Les protéines Tau sont retrouvées en grande majorité dans les neurones du système nerveux central et périphérique ainsi que dans les oligodendrocytes (LoPresti, Muma and De Vries, 2001). En terme de localisation intracellulaire, la protéine Tau est située principalement au niveau des axones des neurones mais elle peut aussi se retrouver au niveau du corps cellulaire, de la membrane plasmique, des synapses mais également au niveau nucléaire. Le cerveau est le tissu où l'expression de Tau est la plus importante, bien que les transcrits Tau se retrouvent également, en quantités moindres, dans divers tissus périphériques tels que le cœur, le foie ou les testicules (Selon Genecards : <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAPT>).

3. Structure de la protéine Tau

3.1 Structure primaire

La longueur de la protéine Tau varie, suite à son épissage, entre 352 et 441 acides aminés (AA). Elle est organisée en différentes régions possédant des propriétés physico-chimiques qui leur sont propres. On retrouve deux domaines principaux : le domaine de projection et le domaine de liaison aux microtubules (Figure 2).

Le domaine de projection est composé de l'extrémité N-terminale, riche en acides aminés acides et de taille variable selon l'inclusion ou l'exclusion des exons 2 et 3, et d'un domaine riche en acides aminés proline. Le domaine de projection est appelé ainsi en raison de sa disposition vis-à-vis des microtubules. En effet, ce domaine se projette depuis les microtubules vers le cytoplasme jouant un rôle dans l'espacement entre les microtubules au niveau des axones (Hirokawa, Shiomura and Okabe, 1988; Avila, 2009). Le domaine riche en proline est quant à lui globalement basique et chargé positivement. Il présente 7 domaines PXXP permettant à Tau d'interagir avec des protéines disposant d'un domaine SH3 (*Src Homology 3*) telles que la protéine Bin 1 (*bridging integrator 1*) ou la kinase Fyn (Morris, Meaghan, Mucke, 2012). Le domaine riche en proline permet également à Tau d'interagir avec l'ARN et l'ADN, au niveau nucléaire, et de lier les microtubules au niveau cytoplasmique (Eidenmüller *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2015). D'ailleurs, ce domaine est impliqué dans la régulation de l'assemblage des microtubules (Eidenmüller *et al.*, 2001). Ces différents partenaires permettent de suggérer que la protéine Tau pourrait être impliquée non seulement dans la stabilisation des microtubules mais également dans la régulation de voies de signalisation cellulaire et dans l'homéostasie nucléaire.

Le domaine de liaison aux microtubules est composé de motifs répétés, codés par les exons 9 à 12, permettant la liaison de la protéine Tau aux microtubules. La présence d'un motif répété additionnel modifie l'affinité de Tau pour les microtubules. En effet, les isoformes 4R possèdent une affinité plus grande envers les microtubules que les isoformes 3R. Ils sont donc plus efficaces pour promouvoir l'assemblage et la stabilité des microtubules (Goedert and Jakes, 1990; Gustke *et al.*, 1994).

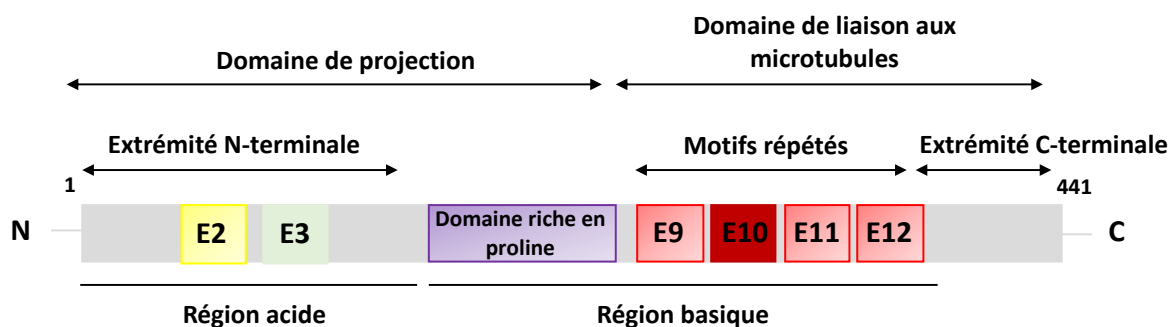


Figure 2 : Représentation schématique des différents domaines de Tau. L'isoforme 2N4R de Tau est l'isoforme la plus longue. Elle est composée de 441 acides aminés. L'extrémité N-terminale (composée des exons 2 et 3) et le domaine riche en proline constituent le domaine de projection. Le domaine de liaison aux microtubules est composé de 4 motifs répétés impliqués dans l'interaction de Tau aux microtubules (E9, E10, E11, E12). *Modifié d'après (Buée et al., 2000).*

3.2 Étude conformationnelle

Initialement, Tau a été décrite comme étant une protéine nativement non conformée et très flexible. Toutefois, l'étude structurale des protéines Tau par différentes méthodes (RMN, dichroïsme circulaire, FRET) a révélé la capacité de Tau à adopter des structures secondaires. En effet, l'extrémité C-terminale peut se replier sur le domaine de liaison aux microtubules de Tau tandis que l'extrémité N-terminale se replie sur l'extrémité C-terminale. Ces différents repliements donnent à la protéine Tau une conformation en forme de « trombone » (Jeganathan *et al.*, 2006). Néanmoins, cette conformation resterait assez rare et très dynamique (Mukrasch *et al.*, 2009).

II. Tau, une protéine dites « pléiotropique »

La protéine Tau est présente majoritairement au niveau des axones où elle joue un rôle majeur dans la stabilisation des microtubules et dans le transport axonal. Cependant, il a été démontré que Tau est également présente dans d'autres compartiments cellulaires tels que les synapses, le soma, la membrane plasmique, les dendrites et le noyau. Au sein de ces différents compartiments, d'autres fonctions de Tau ont été mises en évidence.

1. Tau et la stabilisation des microtubules

Le cytosquelette assure plusieurs fonctions au sein des cellules. Il permet le maintien de la forme des cellules et joue un rôle dans l'organisation des composants cellulaires. Parmi les constituants du cytosquelette, on retrouve les microtubules qui possèdent une forme cylindrique creuse de 25 nm de diamètre. Ils résultent de l'association de dimères de tubuline α et β sous forme de protofilaments. Ces derniers s'assemblent ensuite de façon longitudinale et hélicoïdale formant un microtubule. Les microtubules sont des structures dynamiques qui dépendent d'un équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation des dimères de tubuline.

La protéine Tau interagit avec les microtubules en se liant aux dimères de tubuline. Cette interaction diminue la dépolymérisation des microtubules et augmente leur taux de polymérisation en favorisant l'assemblage des dimères de tubuline. (Weingarten *et al.*, 1975; Drechsel *et al.*, 1992; Breuzard *et al.*, 2013). Cette interaction se fait au niveau de l'interface entre les dimères de tubuline α et β par l'intermédiaire de résidus spécifiques de Tau situés au niveau de son domaine riche en proline et de ses domaines de répétitions (Kadavath *et al.*, 2015). Il existe 4 domaines de répétitions (R1 à R4) encore appelés domaines de liaison aux microtubules. Les isoformes 4R de Tau, possédant 4 domaines de répétitions, favorisent plus efficacement la polymérisation des microtubules comparativement aux isoformes 3R qui ne possèdent que 3 domaines (Goedert and Jakes, 1990). La région de Tau la plus importante pour induire cette polymérisation est localisée entre les domaines de répétitions R1 et R2. Cette région est constituée des acides aminés KVQIINKK et est présente uniquement chez les isoformes Tau 4R (Goode and Feinstein, 1994; Panda *et al.*, 1995). Elle entraîne une capacité d'interaction avec les microtubules 40 fois supérieure aux isoformes 3R (Buée *et al.*, 2000) (Figure 3).

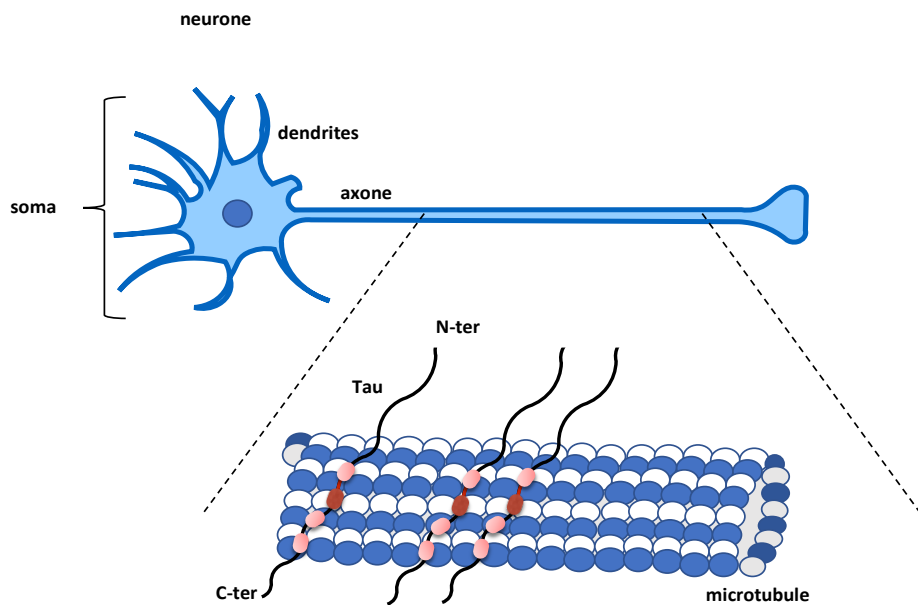


Figure 3 : Interaction de Tau aux microtubules. Tau interagit avec les microtubules par l'intermédiaire de ces motifs répétés (cercles rouges) au nombre de 3 à 4 selon les isoformes et de son domaine riche en proline. Cette interaction stabilise et régule la polymérisation des microtubules.

Le niveau d'acétylation des dimères de tubuline joue un rôle dans la stabilisation des microtubules (Guo, Noble and Hanger, 2017). De façon intéressante, la protéine Tau est capable d'interagir avec HDAC6, une histone déacétylase connue pour réguler le niveau d'acétylation de la tubuline. Il a également été démontré que cette interaction entre Tau et HDAC6 inhibe l'activité de cette dernière (Perez *et al.*, 2009). Ces études permettent de suggérer que l'inhibition de HDAC6 suite à son interaction avec la protéine Tau pourrait augmenter la stabilité des microtubules, bien que des travaux menés *in vivo* apportent des données contradictoires. En effet, il a été mis en évidence chez des souris knockout pour la protéine Tau que le niveau de tubuline acétylée est inchangé en comparaison aux souris contrôles (Rapoport *et al.*, 2002).

2. Tau et le transport axonal

Le transport axonal permet le déplacement des organites le long des microtubules au sein des neurones. Les microtubules jouent le rôle de « rails » le long desquels les protéines motrices circulent. Ces protéines transportent des organites « cargos ».

On retrouve les kinésines impliquées dans le transport « antérograde », c'est-à-dire du corps cellulaire vers la terminaison axonale et les dynéines permettant le transport « rétrograde », c'est-à-dire des synapses vers le soma.

Plusieurs études ont démontré, grâce à des expériences de surexpression, que la protéine Tau régule le transport axonal (Dixit *et al.*, 2008; Talmat-Amar, Arribat and Parmentier, 2018). Cette régulation se fait différemment selon que le transport soit antérograde ou rétrograde. En effet, la surexpression de Tau entraîne une inversion du sens de déplacement des dynéines tandis que les kinésines ont tendance à se détacher des microtubules (Dixit *et al.*, 2008). Par ailleurs, des travaux ont mis en évidence que des mutants Tau, n'exprimant pas les domaines de liaison aux microtubules, ne sont plus capables de réguler le transport. Ces résultats suggèrent que cet effet de Tau dans le transport axonal est dépendant de son interaction aux microtubules (Stamer *et al.*, 2002; Dixit *et al.*, 2008; Mandelkow *et al.*, 2011). Dans ces conditions, les mutants Tau inhibent le transport d'organelles telles que les mitochondries et les peroxysomes dans les cellules de neuroblastome et dans des cultures primaires neuronales murines (Stamer *et al.*, 2002).

3. Le rôle de Tau dans la croissance neuritique

La protéine Tau semble être un élément important pour l'élongation et la maturation des axones. Des études effectuées à partir de cultures primaires de neurones de rats n'exprimant pas la protéine Tau révèlent une perturbation de la croissance des neurites dans ces conditions (Caceres and Kosik, 1990). Tandis que, au contraire, la surexpression de Tau favorise la formation de neurites même dans les cellules non-neuronales (Knops *et al.*, 1991). Ces résultats ont été confirmés plus tard. En effet, une diminution significative de la croissance des axones a été mise en évidence dans des cultures primaires de neurones de souris déficientes en protéines Tau. De façon intéressante, l'expression de Tau humaine dans ces conditions restaure la croissance des dendrites et des axones au sein des neurones (Dawson *et al.*, 2001).

4. Le rôle de Tau dans la signalisation cellulaire

4.1 Tau et la plasticité synaptique

La capacité des synapses à transmettre l'influx nerveux entre les neurones peut varier de façon plus ou moins durable. En effet, cette efficacité de transmission des messages entre deux neurones peut être renforcée ou au contraire diminuée. Ces phénomènes s'appellent la plasticité synaptique, ils sont cruciaux dans les processus de mémorisation.

Il est intéressant de noter que la protéine Tau est présente au niveau des synapses où elle interagit avec le complexe PSD-95/récepteur NMDA, des protéines impliquées dans la plasticité synaptique. D'ailleurs, l'activation des récepteurs NMDA favorise la phosphorylation de la protéine Tau régulant alors son interaction avec la tyrosine kinase Fyn et le complexe PSD95/NMDA (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012). Ces résultats permettent de suggérer que la protéine Tau, de par son interaction avec le complexe PSD95/NMDA, est impliquée dans les phénomènes de plasticité synaptique bien que le mécanisme exact ne soit pas encore totalement élucidé. D'ailleurs, une autre étude a démontré que la stimulation de neurones d'hippocampes de rats avec du BDNF, un facteur neurotrophique favorisant la croissance des neurites, augmente l'expression de la protéine Tau. De plus, l'inhibition de l'expression de Tau par shRNA abolit l'effet du BDNF sur la plasticité synaptique, renforçant l'idée que la protéine Tau joue un rôle dans ce mécanisme (Q. Chen *et al.*, 2012).

4.2 Tau et la réponse à l'insuline

Des études effectuées à partir de cellules neuronales ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la voie de signalisation de l'insuline cérébrale et la plasticité neuronale (Chiu, Chen and Cline, 2008). Plus récemment, un rôle direct de la protéine Tau a été démontré dans la réponse physiologique à l'insuline au niveau du cerveau (Marciniak *et al.*, 2017). La perte d'expression de Tau, dans un modèle murin knockout pour la protéine Tau, altère la dépression à long-terme (LTD) induite par l'insuline au niveau de l'hippocampe ainsi que la réponse anorexigène de l'insuline dans l'hypothalamus. L'étude révèle également que Tau se lie à la protéine PTEN, un

inhibiteur de la voie PI3K-Akt du récepteur de l'insuline, inhibant ainsi ses fonctions. De manière intéressante, les auteurs suggèrent que la perte de fonction de Tau observée dans les tauopathies pourrait empêcher l'interaction entre Tau et PTEN et de ce fait, jouer un rôle dans la résistance à l'insuline observée chez les patients (Marciniak *et al.*, 2017). Cette résistance à l'insuline pourrait également résulter d'une accumulation intra-neuronale de l'insuline chez les patients atteints de tauopathies. En effet, une autre étude a démontré une accumulation de l'insuline sous forme d'oligomères dans les neurones présentant une hyperphosphorylation des protéines Tau (Rodriguez-Rodriguez *et al.*, 2017).

5. Les fonctions de Tau au niveau nucléaire

La protéine Tau est décrite au niveau nucléaire où elle est impliquée dans plusieurs mécanismes (Metuzals *et al.*, 1988; Loomis *et al.*, 1990). La présence de Tau au niveau du noyau a été démontrée dans plusieurs variétés de cellules incluant des neurones murins et humains et dans des lignées cellulaires neuronales et non neuronales (Maina, Al-Hilaly and Serpell, 2016). Toutes les isoformes de la protéine Tau sont présentes dans le noyau bien que l'isoforme 1N4R soit la forme majoritaire dans ce compartiment (Liu and Götz, 2013). Au sein du noyau, la protéine Tau est principalement non phosphorylée (Guo, Noble and Hanger, 2017). D'ailleurs, il semble que le niveau de phosphorylation de Tau contrôle son passage entre le cytoplasme et le noyau. En effet, après un stress hyperthermique, la protéine Tau cytoplasmique se retrouve essentiellement non phosphorylée entraînant sa translocation dans le compartiment nucléaire (Sultan *et al.*, 2011) (Figure 4).

5.1 Tau est présente au niveau du nucléole

Le noyau est un compartiment cellulaire contenant l'essentiel du matériel génétique. Il est composé également du nucléole qui est le lieu de synthèse et d'assemblage des sous-unités des ribosomes. Des études ont révélé la présence de Tau au niveau du nucléole de lignées neuronales et non-neuronales humaines et dans des lignées neuronales de singes (Loomis *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Thurston, Zinkowski and Binder, 1996). Plusieurs travaux ont testé l'activité de Tau au niveau de cette structure. Une étude a mis en évidence une baisse de la synthèse des ARN ribosomiques

couplée à une instabilité de l'ADN ribosomal lorsque l'expression de Tau est diminuée (Bou Samra *et al.*, 2017). Plus récemment, une autre étude a révélé à partir de cellules de neuroblastome une interaction entre Tau et TIP5, une protéine impliquée dans la stabilité de l'hétérochromatine et la répression de la transcription de l'ADN ribosomal. De façon intéressante, la diminution de l'expression de Tau par la transfection de si-RNA dans ce modèle cellulaire entraîne une augmentation de l'expression des gènes ribosomaux couplée à une déstabilisation de l'hétérochromatine et une diminution de la méthylation de l'ADN (Maina *et al.*, 2018). Ces résultats suggèrent qu'en condition physiologique Tau puisse jouer un rôle dans la répression de l'expression des gènes ribosomaux. Les résultats de cette étude sont contradictoires à ceux présentés ci-dessus. Cependant, ce rôle répresseur de Tau dans l'expression des gènes ribosomaux pourrait résulter de son interaction avec la protéine TIP5 visualisée uniquement dans les cellules de neuroblastome. Dans l'ensemble, ces études mettent en évidence l'importance de Tau dans la synthèse des ARN ribosomiques et dans la stabilité de l'ADN ribosomal.

5.2 Les différents rôles de Tau au niveau de l'ADN

L'interaction de Tau à l'ADN se fait par l'intermédiaire de son domaine riche en proline et de ses domaines de liaison aux microtubules (Wei *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2015). *In vitro*, Tau se lie préférentiellement à certaines régions de l'ADN telles que les petits sillons (Wei *et al.*, 2008). D'autres études ont démontré que la protéine Tau est capable d'interagir spécifiquement avec l'ADN satellite péricentromérique riche en nucléotides A/T (Sjoberg, 2006).

5.2.1 Un lien étroit entre Tau et la chromatine

La présence de Tau dans la fraction chromatinienne de cellules de neuroblastome a été révélée par fractionnement subcellulaire (Greenwood and Johnson, 1995). Dans des cultures primaires de neurones murines, Tau colocalise avec l'hétérochromatine péricentromérique (Mansuroglu *et al.*, 2016). L'hétérochromatine péricentromérique est composée majoritairement de séquences satellites répétées riches en histones 3 tri-méthylées au niveau de la lysine 9 (H3K9me3) et de protéines HP1 alpha (*Heterochromatin protein 1 alpha*). La présence de ces marques épigénétiques

spécifiques permettent la compaction de la chromatine régulant la stabilité du génome et l'expression des gènes de cette région. Cette étude révèle également que le déficit d'expression de Tau dans les neurones de souris (knockout Tau) altère la distribution des marques H3K9me3 et HP1 alpha. Ces données suggèrent un rôle physiologique de Tau dans la régulation de l'intégrité de l'hétérochromatine péricentromérique neuronale (Mansuroglu *et al.*, 2016). D'ailleurs, une altération de ces marques épigénétiques associée à une perte d'hétérochromatine péricentromérique a été observée dans des cerveaux Alzheimer humains ainsi que dans des modèles Alzheimer chez la drosophile et la souris. De façon intéressante, cette relaxation de l'hétérochromatine observée dans les cerveaux Alzheimer entraîne l'expression aberrante de certains gènes participant à la dégénérescence neuronale (Frost *et al.*, 2014).

5.2.2 Tau une protéine régulatrice de la transcription ?

De par son interaction à l'ADN et son rôle dans l'intégrité de l'hétérochromatine, il apparaît de plus en plus clairement que la protéine Tau pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression génique. En effet, une approche transcriptomique par micro-arrays effectuée sur des lysats de cerveaux de souris sauvages ou knockout-Tau, a révélé que Tau régule l'expression de nombreux gènes (Oyama *et al.*, 2004; Barreda and Avila, 2011). Parmi ces gènes on retrouve BAF57, une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine réprimant l'expression de gènes neuronaux (Gómez de Barreda *et al.*, 2010). Ainsi, l'effet de Tau dans la régulation de l'expression génique pourrait être direct, par son interaction avec l'ADN, ou indirect. Cet effet indirect pourrait résulter du rôle de Tau dans le remodelage de la chromatine (Frost *et al.*, 2014; Mansuroglu *et al.*, 2016) ou par son interaction avec des protéines impliquées dans la régulation de l'expression génique (Gómez de Barreda *et al.*, 2010; Gunawardana *et al.*, 2015).

5.2.3 Rôle protecteur de Tau envers les acides nucléiques

Différents travaux démontrent l'implication de la protéine Tau dans la stabilisation et la protection des acides nucléiques. En effet, Tau est capable de protéger l'ADN de la dénaturation thermique *in vitro* (Hua and He, 2003). Une autre étude a démontré

l'implication de Tau dans la protection de l'ADN contre les radicaux libres (Wei *et al.*, 2008). Le stress oxydant est particulièrement présent dans les neurones en raison d'une forte activité métabolique et mitochondriale. Ces espèces réactives à l'oxygène (ROS) sont connues pour induire des dommages à l'ADN (Barzilai, Biton and Shiloh, 2008). Des études réalisées au sein du laboratoire ont mis en évidence que Tau protège l'ADN en condition de stress oxydant dans des cultures primaires de neurones corticaux chez la souris (Sultan *et al.*, 2011). Plus récemment, ce rôle protecteur de Tau a été confirmé *in vivo*. En effet, les souris n'exprimant pas la protéine Tau (knockout Tau) présentent une augmentation des dommages à l'ADN et aux ARN en condition physiologique et en condition de stress oxydant (Violet *et al.*, 2014). Ces résultats confèrent ainsi un rôle plus général de Tau dans la protection des acides nucléiques.

Actuellement, les mécanismes moléculaires responsables de ce rôle protecteur de Tau envers les acides nucléiques restent à ce jour inconnus. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats. La première est celle d'une protection physique via l'interaction de Tau avec l'ADN, la deuxième hypothèse est celle d'un contrôle de l'expression, au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel, de gènes impliqués dans ces fonctions.

Tau nucléaire

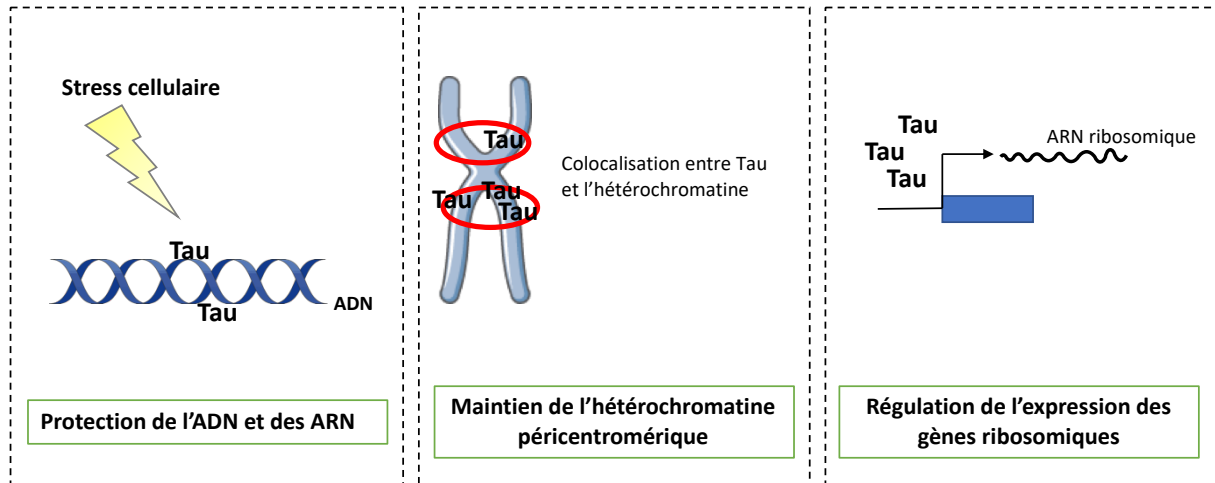
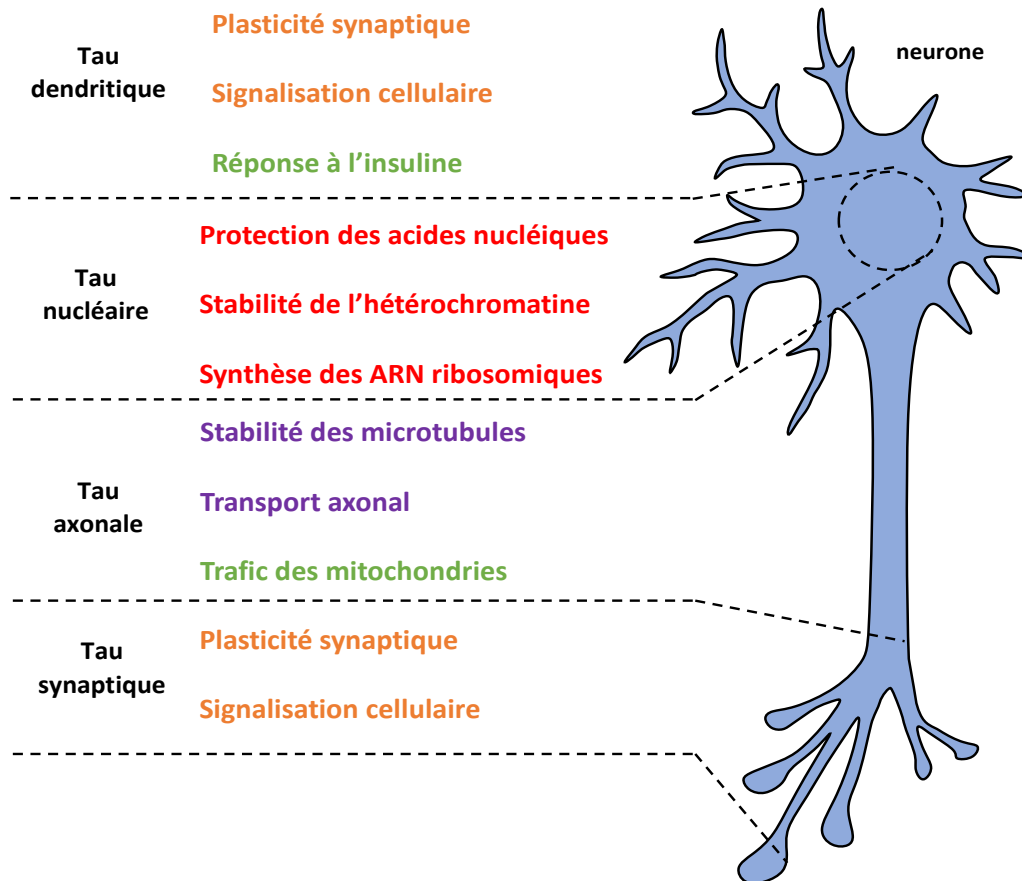


Figure 4 : Les fonctions connues de Tau nucléaire. De gauche à droite : Tau protège les acides nucléiques (ADN et ARN) en condition physiologique et en réponse à un stress cellulaire. Tau colocalise également avec l'hétérochromatine péricentromérique dont elle maintient l'intégrité. Tau est présente au niveau du nucléole où elle est impliquée dans l'expression des gènes ribosomiques et dans le maintien de l'intégrité de l'ADN ribosomal.

5.3 Tau et le métabolisme des ARN

Bryan et ses collaborateurs proposent en 1975 que la protéine Tau est capable d'interagir avec les ARN *in vitro* inhibant ainsi son rôle dans la polymérisation des microtubules (Bryan, Nagle and Doenges, 1975). Par la suite, d'autres études ont montré que les ARN stimulent l'agrégation de Tau sous la forme de filaments hélicoïdaux appariés (PHF, pour le terme en anglais « *paired helical filament* »), une structure caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Kampers *et al.*, 1996; Hasegawa *et al.*, 1997). La séquestration des ARN dans les PHF a également été démontrée (Ginsberg *et al.*, 1997). Finalement, des travaux *in vitro* ont mis en évidence que la protéine Tau peut lier les ARN au niveau de séquences non spécifiques. Cette interaction se fait par l'intermédiaire du domaine riche en proline et du domaine de liaison aux microtubules de Tau. De plus, Tau co-localise avec l'ARN nucléaire et cytoplasmique dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y (Wang *et al.*, 2006).

A ce jour, le rôle de cette interaction entre Tau et les ARN reste globalement méconnue. Récemment, il a été mis en évidence la présence de Tau au niveau du ribonucléoprotéome. En effet, Tau est capable d'interagir avec des protéines impliquées dans la traduction et le métabolisme des ARN, telles que les ARN hélicases à boîte DEAD DDX6 suggérant une implication de Tau dans ces mécanismes (Gunawardana *et al.*, 2015). D'autres études ont démontré une interaction directe entre Tau et les ribosomes dans des cerveaux Alzheimer humains entraînant une diminution de l'efficacité de traduction (Meier *et al.*, 2016). Il a été mis en évidence une interaction entre Tau et TIA1 également, une protéine liant les ARN impliquée dans la formation des granules de stress (Apicco *et al.*, 2017; Vanderweyde *et al.*, 2017). Ces granules sont des agrégats réversibles cytoplasmiques, d'ARN et de protéines, favorisant la survie cellulaire en condition de stress. TIA1 possède de nombreux partenaires parmi lesquels on retrouve des protéines impliquées dans l'épissage ou le transport des ARNm telles que snRNP70, DDX5, et EWSR1. D'ailleurs, il a été mis en évidence la présence de ces protéines dans le complexe Tau-TIA1 et l'implication de Tau dans la formation des granules de stress (Vanderweyde *et al.*, 2017).



Fonctions : **Transmission des signaux** – **Nucléaire** – **Métabolique** – **Transport**

Figure 5 : Schéma récapitulatif des différentes fonctions physiologiques des protéines Tau. Tau est impliquée dans diverses fonctions selon sa localisation au sein des cellules. Au niveau du cytoplasme, elle est impliquée dans la transmission des signaux (plasticité synaptique et signalisation cellulaire), le métabolisme (réponse à l'insuline et trafic des mitochondries), le transport (stabilité des microtubules et transport axonal). Tau est aussi présente au noyau où elle joue un rôle dans l'activité nucléaire (protection des acides nucléiques, stabilité de l'hétérochromatine péri-centromérique, synthèse des ARN ribosomiques).

III. Les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau

1. Tau, une protéine phosphorylée

La phosphorylation de la protéine Tau est régulée au cours du développement. Dans le cerveau des fœtus, les protéines Tau sont plus fortement phosphorylées que dans le cerveau adulte. On dénombre en moyenne 7 phosphates par molécule de Tau chez le fœtus pour 2 phosphates par molécule à l'âge adulte (Kanemaru *et al.*, 1992). L'isoforme la plus longue de la protéine Tau (2N4R) possède 85 sites potentiels de phosphorylation, soit 45 résidus sérine, 35 thréonine et 5 tyrosine représentant respectivement 53%, 41% et 6% des sites de la protéine Tau pouvant être phosphorylés (Hanger, Anderton and Noble, 2009).

Les sites de phosphorylation de Tau sont situés au niveau de certains motifs constitués notamment de résidus sérines ou thréonines suivis d'une proline. Ils sont la cible de kinases appelées : PDPK (*proline-directed protein kinases*) parmi lesquelles on retrouve les MAP kinases (*mitogen activated protein*), les GSK 3 alpha/beta kinases (*glycogen synthase kinase*), les « cyclin-dependent kinase » cdc2 et cdk5 et d'autres kinases activées suite à un stress : les SAP kinases (*Stress-activated protein*) (Drewes *et al.*, 1992; Baumann *et al.*, 1993; Goedert *et al.*, 1997). Les autres sites de phosphorylation peuvent être la cible de kinases appelées : non PDKP (*non-proline-directed protein kinases*) regroupant les TTBK 1/2 kinases (*Tau-tubulin kinase 1/2*), les MARKs kinases (*microtubule affinity-regulating kinases*) (MARKs), les CaMKII kinases (*calcium ou calmodulin-dependent protein kinase II*), ou encore les protéines kinases C (PKC) ou cAMP-dépendant protéines kinases A (PKA) (Baudiers and Cole, 1988; Jicha *et al.*, 1999). Un dernier groupe de kinases existe, ce sont les protéines kinases spécifiques des résidus tyrosines, comme les kinases Src, Abl, Syk et Fyn (Derkinderen *et al.*, 2005; Reynolds *et al.*, 2008; Martin, Latypova and Terro, 2011).

La phosphorylation de Tau est régulée également par l'activité de phosphatases, notamment la protéine phosphatase 2A (PP2A). Elle régule 70% de la phosphorylation de la protéine Tau (Goedert *et al.*, 1995; Bennechib *et al.*, 2000). De manière moins importante, d'autres phosphatases régulent le niveau de phosphorylation de Tau : PP1, PP2B et PP5 à hauteur respectivement de 11, 7 et 10% (Liu *et al.*, 2005). Les

phosphatases sont des protéines sensibles aux changements de température. En effet, l'hypothermie inhibe de façon exponentielle leur activité. Cette spécificité pourrait expliquer l'hyperphosphorylation de la protéine Tau observée au cours de l'hibernation d'animaux et lors d'anesthésies (Planel *et al.*, 2007).

2. Les autres modifications post-traductionnelles de Tau

Bien que la phosphorylation soit la plus étudiée des modifications post-traductionnelles, une multitude d'autres modifications peuvent toucher les protéines Tau. Certaines de ces modifications sont retrouvées uniquement en condition pathologique. C'est le cas notamment pour la troncation, la glycation, la deamidation et l'isomérisation détectées uniquement à partir de protéines Tau extraites de cerveaux Alzheimer (Watanabe *et al.*, 2004). Les autres modifications post-traductionnelles peuvent être présentes en condition physiologique. On retrouve par exemple la méthylation, l'ubiquitylation, la sumoylation, l'acétylation... (Guo, Noble and Hanger, 2017) (Figure 6).

2.1 L'acétylation des protéines Tau

L'acétylation des protéines Tau est médiée par l'ajout d'un groupement acétyle suite à l'action de l'acétyle transférase CBP (*CREB-binding protein*) tandis que la déacétylation résulte de l'activité des protéines SIRT1 (*sirtuin 1*) ou de l'histone déacetylase 6 (HDAC 6) (Cook, Stankowski, *et al.*, 2014). La protéine Tau est acétylée au niveau de résidus lysines localisés principalement dans les domaines de liaison aux microtubules et dans le domaine riche en proline. Tau possède également une activité acétyle-transférase intrinsèque. Les résidus lysines acétylés par Tau se trouvent essentiellement au niveau des domaines de liaison aux microtubules incluant notamment la lysine 280 (Cohen *et al.*, 2013; Cook, Stankowski, *et al.*, 2014; Guo, Noble and Hanger, 2017).

2.2 La O-glycosylation des protéines Tau

Les protéines Tau peuvent également être glycosylées. On retrouve notamment la O-glycosylation qui consiste en l'ajout d'un résidu N-acetyl-glucosamine (O-GlcNac) au niveau des acides aminés sérines et thréonines des protéines Tau. Cette modification post-traductionnelle semble pouvoir réguler le niveau de phosphorylation de Tau. En effet, la présence de sites O-GlcNac entraîne une diminution du niveau de phosphorylation des protéines Tau (Liu *et al.*, 2004; Smet-Nocca *et al.*, 2011). Ces effets pourraient s'expliquer par le fait que les enzymes responsables de ces modifications post-traductionnelles ont pour cible les mêmes résidus.

2.3 La sumoylation des protéines Tau

Tau est un substrat pour la sumoylation dont le site majeur est la lysine 340 située au niveau de son domaine C-terminal. La sumoylation de Tau est corrélée avec une augmentation de la phosphorylation des protéines Tau et une baisse de son ubiquitylation en lignée cellulaire. De façon intéressante, SUMO-1 (*small ubiquitin-like modifier protein 1*) co-localise avec les protéines Tau hyperphosphorylées dans les cerveaux Alzheimer suggérant que cette modification puisse être impliquée dans la mise en place des tauopathies (Luo *et al.*, 2014).

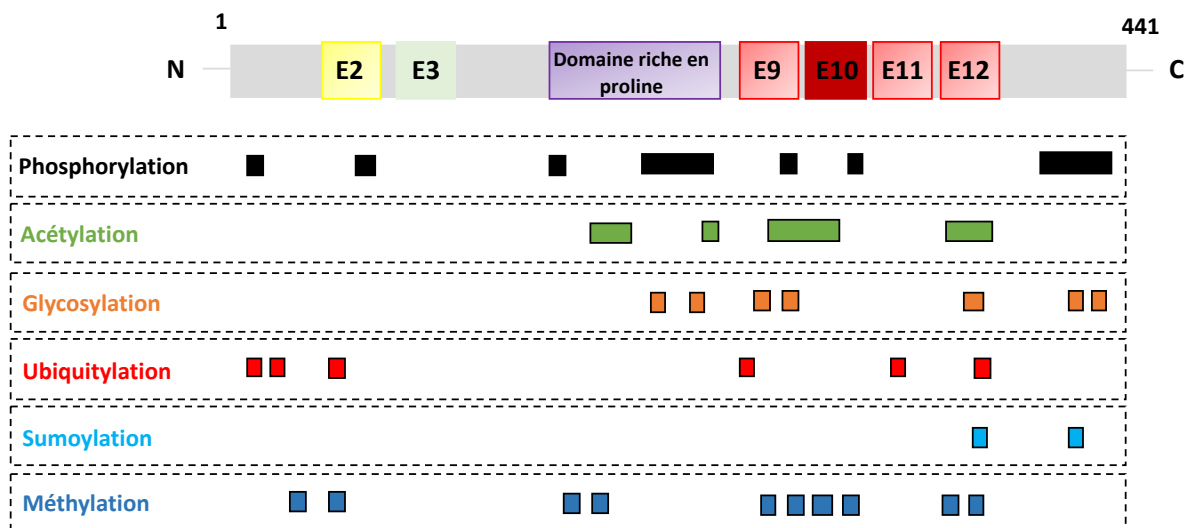


Figure 6 : Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de Tau. Représentation de quelques modifications post-traductionnelles observées sur la protéine Tau. Les barres colorées indiquent de façon approximative les différentes localisations des modifications observées sur l'isoforme 2N4R de Tau. *Modifié d'après* (Guo, Noble and Hanger, 2017).

IV. Le rôle de la phosphorylation de Tau dans la régulation de ses fonctions physiologiques

1. Phosphorylation de Tau et stabilité des microtubules

Le rôle de Tau dans la stabilisation des microtubules est dépendant de son niveau de phosphorylation (Figure 7). En effet, il a été démontré que la déphosphorylation de la protéine Tau favorise son interaction aux microtubules et la stabilisation de ces derniers (Lindwall and Cole, 1984). D'autres travaux ont déterminé que la phosphorylation de Tau au niveau de son domaine de liaison aux microtubules, plus particulièrement sur le motif KXGS, est suffisante pour diminuer de manière significative la capacité de Tau à lier les microtubules *in vitro* (Biernat *et al.*, 1993). Plus tard, l'importance de la phosphorylation de sites spécifiques de Tau a été déterminée. La phosphorylation des résidus Ser262, Ser293, Ser324 et Ser356, situés au niveau du domaine de liaison aux microtubules de Tau, diminue de façon importante la capacité de la protéine Tau à lier les microtubules et donc à les stabiliser (Drewes *et al.*, 1995). Le niveau de phosphorylation de la thréonine 231, située dans le domaine riche en proline, semble également avoir une importance particulière dans la fonctionnalité des protéines Tau. En effet, sa phosphorylation diminue significativement la capacité de Tau à interagir avec les microtubules et de ce fait son habilité à les stabiliser (Cho and Johnson, 2003, 2004). De plus, le fractionnement de lysats cellulaire séparés en fraction soluble et insoluble (présence des cytosquelettes) révèle la présence de quasiment l'entièreté des protéines Tau phosphorylées au niveau de l'épitope Thr231 dans la fraction soluble (Hamdane *et al.*, 2003). Des études menées *in vitro* ont également mis en évidence que la phosphorylation des sites Thr231 et Ser235 entraîne une forte baisse de l'interaction entre Tau et les microtubules (Sengupta *et al.*, 1998; Avila, 2009).

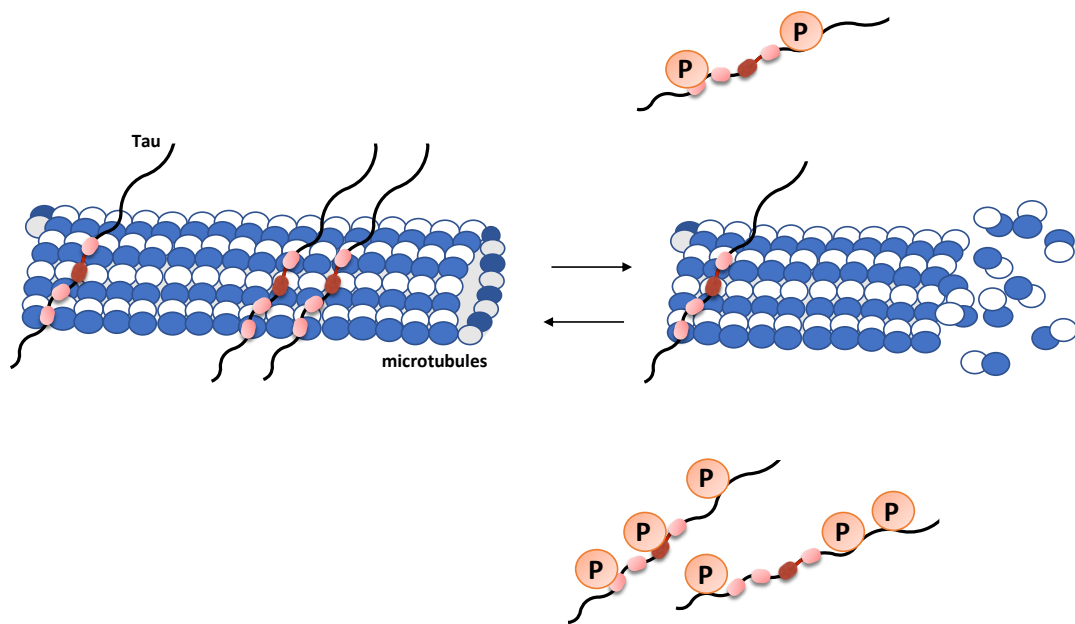


Figure 7 : La phosphorylation de Tau régule la polymérisation des microtubules. La protéine Tau lie les microtubules régulant leur stabilité. L'augmentation du niveau de phosphorylation de Tau abolit son interaction aux microtubules et entraîne une dépolymérisation de ces derniers.

2. Phosphorylation de Tau et interaction avec ses partenaires

Le niveau de phosphorylation des protéines Tau régule son interaction avec certains de ses partenaires. La phosphorylation *in vitro* de Tau, notamment au niveau de son domaine riche en proline, diminue sa capacité à interagir avec la protéine kinase Fyn (Reynolds *et al.*, 2008). A l'inverse, la phosphorylation de Tau au niveau de la thréonine 231 favorise son interaction avec PIN 1 (*peptidyl-propyl cis/trans isomérase*), une protéine chaperone qui modifie la conformation de Tau facilitant ainsi l'interaction de cette dernière avec la phosphatase PP2A (Lu *et al.*, 1999). De nombreux sites de phosphorylation de Tau sont localisés au niveau de son domaine d'interaction avec l'ADN. D'ailleurs, il est apparu que la phosphorylation de ces sites, dont la thréonine 231, réduit fortement sa capacité à lier l'ADN (Qi *et al.*, 2015). De plus, une approche par PLA (*proximity ligation assay*), à partir de cultures primaires de neurones de rats, a révélé que l'interaction entre Tau et la protéine BIN 1 (*bridging integrator 1*) est abolie lorsque Tau est phosphorylée au niveau du résidu Thr231, tandis que la phosphorylation des résidus Ser202 et Ser396-Ser404 n'a pas d'effet sur l'interaction entre les deux protéines (Sottejeau *et al.*, 2015).

3. *Phosphorylation de Tau, activité nucléaire et localisation subcellulaire*

Comme décrit précédemment, l'interaction de Tau avec l'ADN est régulée par son niveau de phosphorylation (Qi *et al.*, 2015). De plus, différentes études ont mis en évidence que la phosphorylation de Tau régule son rôle dans la protection de l'ADN nucléaire. En effet, l'hyperphosphorylation de Tau prévient son effet dans la protection des dommages à l'ADN dans la lignée cellulaire N2A et dans un modèle murin de tauopathies connu pour entraîner l'agrégation et l'hyperphosphorylation de Tau : les souris Thy-Tau22 (Lu *et al.*, 2013; Violet *et al.*, 2015). Par ailleurs, la phosphorylation de Tau module également sa localisation au niveau nucléaire. En effet, la translocation de Tau au noyau augmente en condition de stress oxydant dans le cortex de souris sauvages tandis que ce transfert n'est pas observé chez les souris transgéniques THY-Tau22 (Violet *et al.*, 2015). De façon intéressante, la présence de Tau au noyau est souvent identifiée par l'utilisation de l'anticorps anti-Tau 1, connu pour détecter la protéine Tau déphosphorylée au niveau des sérines 192, 198, 199 et 202 (Loomis *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2015). Ainsi, l'absence de phosphorylation au niveau de ces sites est nécessaire pour la présence de Tau au noyau. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance du niveau de phosphorylation de Tau dans la régulation de ses fonctions mais aussi dans sa localisation.

Par exemple, la présence de Tau au niveau de la membrane plasmique des neurones est corrélée à un faible niveau de phosphorylation au niveau de la Thr231 (Maas, Eidenmüller and Brandt, 2000). De plus, il a été démontré que les protéines Tau phosphorylées sont essentiellement localisées au niveau du compartiment somato-dendritique des neurones de rats tandis que les formes peu phosphorylées sont principalement situées au niveau des axones (Tashiro *et al.*, 1997).

V. D'autres modifications post-traductionnelles régulent l'activité de Tau

L'acétylation de Tau module également son activité physiologique. En effet, l'acétylation de certains résidus lysine tels que Lys163, Lys280, Lys281 et Lys369 inhibe la dégradation de Tau par le protéasome tandis que d'autres sites (Lys259, Lys290, Lys321, Lys353) favorisent sa dégradation, inhibent sa phosphorylation et son agrégation (Min *et al.*, 2010; Cook, Carlomagno, *et al.*, 2014). De façon intéressante, des études menées *in vitro* ont démontré que l'acétylation de la protéine Tau au niveau de résidus lysines spécifiques altère sa capacité à stabiliser les microtubules et favorise son agrégation (Cohen *et al.*, 2011). Au cours de cette étude, l'expression de mutants mimant la protéine Tau acétylée en lignée cellulaire a mis en évidence que l'acétylation de Tau au niveau des lysines Lys163, Lys280, Lys281 et Lys369 entraîne une baisse significative de la polymérisation des microtubules (diminution de 40%) comparativement aux mutants Tau non acétylés. Le niveau d'acétylation de Tau semble également moduler l'activité des synapses. Plus récemment, l'étude de souris transgéniques exprimant des mutants de la protéine Tau mimant son acétylation au niveau des résidus Lys274 et Lys281 a démontré que ces dernières présentent une altération de la plasticité synaptique associée à des troubles de la mémoire (Tracy *et al.*, 2016).

Bien qu'il ait été démontré que l'ubiquitination de Tau notamment au niveau de la lysine 48 favorise sa dégradation par le protéasome (Petrucci *et al.*, 2004), peu de données existent concernant les effets des autres modifications post-traductionnelles de Tau dans la régulation de ses activités physiologiques.

Chapitre 2 : La protéine Tau et les maladies neurodégénératives

Tau est une protéine impliquée dans le développement de nombreuses maladies neurodégénératives, regroupées sous le terme de tauopathies. Actuellement, on dénombre un peu plus d'une vingtaine de tauopathies (Tableau 1). Elles sont caractérisées par une agrégation des protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées. Ces agrégats sont responsables du dysfonctionnement des neurones observé dans ces maladies aboutissant à la mort cellulaire. Bien que les agrégats Tau soient présents dans l'ensemble des tauopathies, ces pathologies présentent des caractéristiques qui leurs sont propres. En effet, on distingue des spécificités sur le plan clinique, neuropathologique, biochimique et génétique.

Dégénérescence corticobasale
Dégénérescences neurofibrillaires diffuses avec calcification
Dégénérescence à grains argyrophiles
Démence familiale de type danois
Démence familiale de type britannique
Démence frontotemporale avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17
Démence liée à la trisomie 21
Démence lobaire frontotemporale (causée par des mutations de C9orf72)
Dystrophie myotonique
Encéphalopathie traumatique chronique
Gliose sous-corticale progressive familiale
Maladie à prion avec accumulation neurofibrillaires (causées par des mutations PNRP)
Maladie d'Alzheimer
Maladie de Niemann-Pick de type C
Maladie de Pick
Panencéphalite sclérosante subaigüe
Paralysie supranucléaire progressive
Parkinsonisme de Guadeloupe
Retard mental associé à SLC9A6
Sclérose latérale amyotrophique avec pathologie neurofibrillaire
Syndrome parkinsonien post-encéphalite
Tauopathie de la substance blanche avec inclusions gliales globulaire
Tauopathie primaire liée au vieillissement
Tableau 1 : Liste des différentes tauopathies

Au cours de ce chapitre nous nous intéresserons au rôle de la protéine Tau dans le développement des tauopathies et plus particulièrement à leurs diverses caractéristiques notamment sur le plan génétique et biochimique. Nous étudierons également les mécanismes d'agrégation des protéines Tau et l'impact de ce phénomène au niveau fonctionnel. Nous détaillerons dans ce chapitre uniquement les caractéristiques et les pathologies pertinentes pour la bonne compréhension de ce projet.

I. Les tauopathies, des maladies hétérogènes.

1. Des caractéristiques histologiques variées

Selon les tauopathies, les agrégats Tau peuvent prendre divers aspects histologiques. Dans la maladie d'Alzheimer, les agrégats forment des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) tandis que dans la maladie de Pick, ils forment les corps de Pick. Une autre forme de lésion a été observée chez les patients atteints de paralysie supranucléaire progressive. En effet, dans cette pathologie la protéine Tau peut s'accumuler dans les cellules gliales. Dans ce cas, on parle de « touffes gliales » correspondant à l'agrégation des protéines Tau dans les cellules astrocytaires (Tolnay and Probst, 2003; Hasegawa, 2006) (Figure 8).

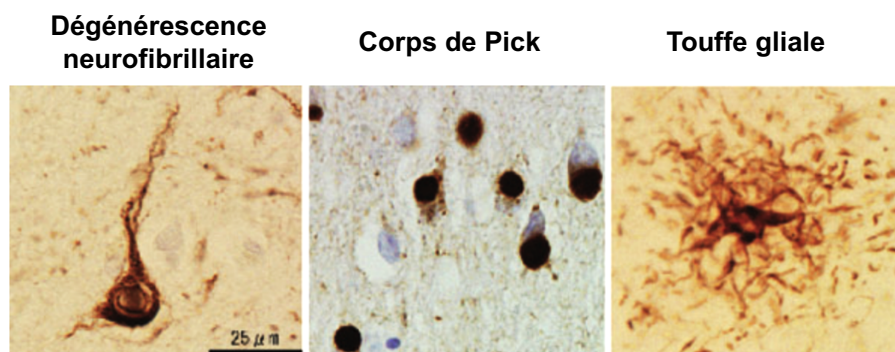


Figure 8 : Caractéristiques des agrégats Tau. L'étude par immunohistochimie de coupes de cerveaux provenant de patients atteints par différentes tauopathies révèle divers aspects des agrégats Tau. De gauche à droite : Les protéines Tau s'agrègent sous la forme de dégénérescence neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer. On retrouve les corps de Pick dans la maladie de Pick et les touffes gliales dans la paralysie progressive supranucléaire. Les agrégats Tau ont été révélés à l'aide de l'anticorps anti-AT8 ciblant les protéines Tau phosphorylées au niveau des résidus Ser202 et Ser205. *Modifié d'après* (Hasegawa, 2006).

2. Classification biochimique des tauopathies

L'étude du profil de migration après électrophorèse SDS-PAGE monodimensionnelle, à partir de tissus de cerveaux humains provenant de patients atteints de différentes tauopathies, met en évidence que la composition des agrégats en isoformes de Tau varie selon les tauopathies. Ainsi, le profil biochimique des agrégats Tau a permis d'identifier 4 classes différentes de tauopathies (Figure 9).

On distingue la classe 1 où l'ensemble des isoformes Tau sont présentes dans les agrégats. Cette classe est la plus importante car elle comprend la majorité des tauopathies dont la maladie d'Alzheimer. La classe 2 est caractérisée par la présence des isoformes 4R de Tau dans les agrégats. Cette classe regroupe notamment, la paralysie supranucléaire progressive et la démence cortico-basale. La classe 3, où on retrouve la maladie de Pick, contient majoritairement les isoformes 3R. La classe 4 est représentée par une seule tauopathie qui est la dystrophie myotonique où le profil de migration révèle une bande majoritaire de 60 kDa correspondant aux agrégats Tau constitués dans ce cas essentiellement des isoformes excluant les exons 2,3 et 10 (Sergeant *et al.*, 1997; Sergeant, Wattez and Delacourte, 1999; Sergeant, Delacourte and Buée, 2005).

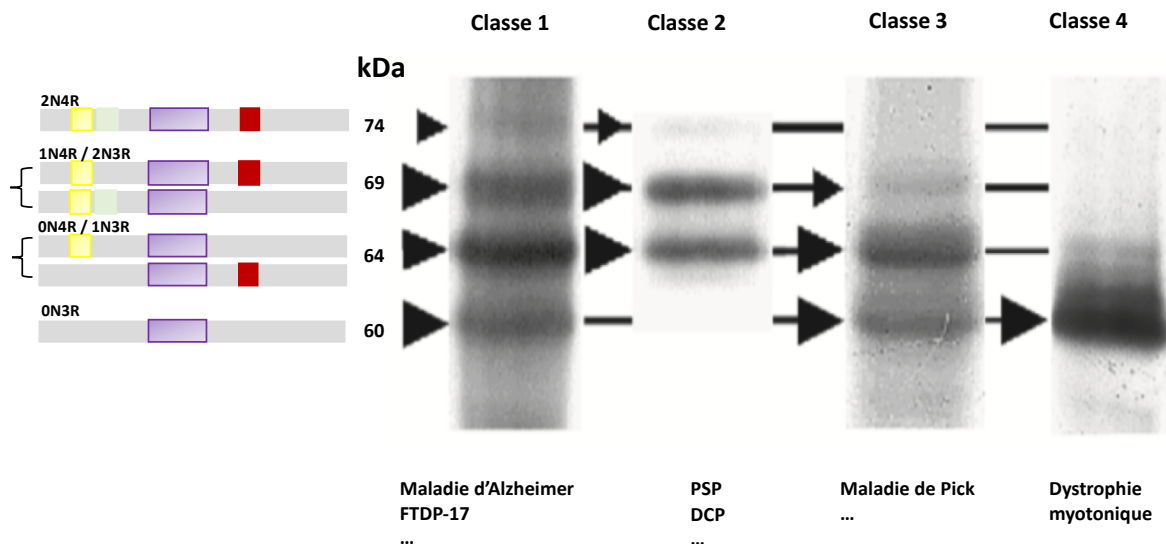


Figure 9 : Le « code barre » des tauopathies. Représentation des 4 profils de migration électrophorétiques obtenus à partir de cerveaux de patients atteints par différentes tauopathies. Les protéines Tau pathologiques ont été révélées à l'aide de l'anticorps AD2 qui cible Tau phosphorylée au niveau des Ser396 et Ser404. *Modifié d'après* (Sergeant, Delacourte and Buée, 2005).

3. Les causes des tauopathies

Les évènements à l'origine des tauopathies peuvent être multiples. Ces pathologies sont en grande majorité sporadiques mais elles peuvent également résulter de diverses mutations génétiques. Parmi ces tauopathies, on peut citer par exemple : la dystrophie myotonique, les démences liées à la trisomie 21, la paralysie supranucléaire progressive (PSP) ou encore les démences fronto-temporales avec parkinsonisme liées au chromosome 17 (FTDP-17). Nous nous intéresserons plus particulièrement aux FTDP-17 car c'est la seule tauopathie où un lien direct a été décrit entre le développement de cette pathologie et des mutations au niveau du gène codant pour la protéine Tau, MAPT.

3.1 Les origines génétiques des tauopathies

3.1.1 Les mutations du gène MAPT

Les démences fronto-temporales avec parkinsonisme liées au chromosome 17 (FTDP-17) permettent de se rendre compte de l'importance des protéines Tau dans les mécanismes de dégénérescence neurofibrillaire. En effet, 53 mutations différentes ont été identifiées pour cette pathologie au niveau du gène codant pour la protéine Tau (Wolfe, 2009; Ghetti *et al.*, 2015) (Figure 10). La plupart de ces mutations sont localisées au niveau du domaine de liaison aux microtubules de Tau altérant ainsi sa capacité à interagir avec les microtubules (Hasegawa, Smith and Goedert, 1998). D'autres mutations, telles que R406W, V337M et G272V, favorisent la phosphorylation des protéines Tau en facilitant leur reconnaissance par les kinases entraînant ainsi une diminution de leur capacité à lier les microtubules (Alonso *et al.*, 2004). Certaines mutations, localisées notamment au niveau du site d'épissage 5', modifient l'épissage alternatif de l'exon 10 entraînant un déséquilibre du ratio des isoformes 3R/4R de Tau (Hutton *et al.*, 1998; D'Souza *et al.*, 1999). Des travaux ont montré que certaines mutations faux sens, telles que K257T, I260V, G272V, G335V ou encore Q336R, confèrent aux protéines Tau la capacité à former des agrégats *in vitro* (Chang *et al.*, 2008; Wolfe, 2009). Un grand nombre de mutations identifiées chez les patients atteints de FTDP-17 sont localisées au niveau de l'exon 10 du gène codant pour la

protéine Tau, c'est notamment le cas pour les mutations faux sens P301L (Dumanchin *et al.*, 1998; Hutton *et al.*, 1998) et P301S (Bugiani *et al.*, 1999; Sperfeld *et al.*, 1999).

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux mutants MAPT : P301S et P301L. Ces deux mutations partagent des caractéristiques communes. Elles diminuent toutes les deux l'interaction de la protéine Tau aux microtubules favorisant la déstabilisation de ces derniers (Hong 1998 ; Bugiani 1998). Elles sont également connues pour promouvoir l'agrégation des protéines Tau (Sergeant *et al.*, 2008). Les mutations P301S et P301L présentent aussi quelques différences. En effet, le rôle de P301S sur la stabilité des microtubules est moins important que celui de P301L. La mesure par turbidimétrie du niveau de polymérisation des microtubules en présence de la protéine Tau Wild-type, Tau P301S ou Tau P301L, révèle que ces dernières induisent respectivement la polymérisation de 100%, 20% et 10% des dimères de tubuline (Bugiani *et al.*, 1999). Une autre spécificité de la mutation P301S est l'âge d'apparition de la pathologie FTDP-17. La maladie se développe vers 30 ans chez les familles portant la mutation P301S tandis que l'âge d'apparition de la pathologie chez les familles possédant la mutation P301L est beaucoup plus tardif (Bugiani *et al.*, 1999). Le remplacement du résidu proline par une sérine pour la mutation P301S pourrait expliquer les différences observées avec la mutation P301L. En effet, la présence de la sérine pourrait créer un nouveau site potentiel de phosphorylation de Tau au niveau du second domaine d'interaction aux microtubules. Or la phosphorylation de Tau est connue pour moduler son interaction aux microtubules. Ces observations pourraient expliquer pourquoi la mutation P301S promeut le développement de la pathologie FTDP-17 de façon plus précoce que P301L. D'ailleurs, une perte neuronale plus importante est observée dans les modèles murins transgéniques surexprimant la protéine Tau mutée P301S comparé aux modèles surexprimant P301L (Allen *et al.*, 2002; Götz *et al.*, 2010).

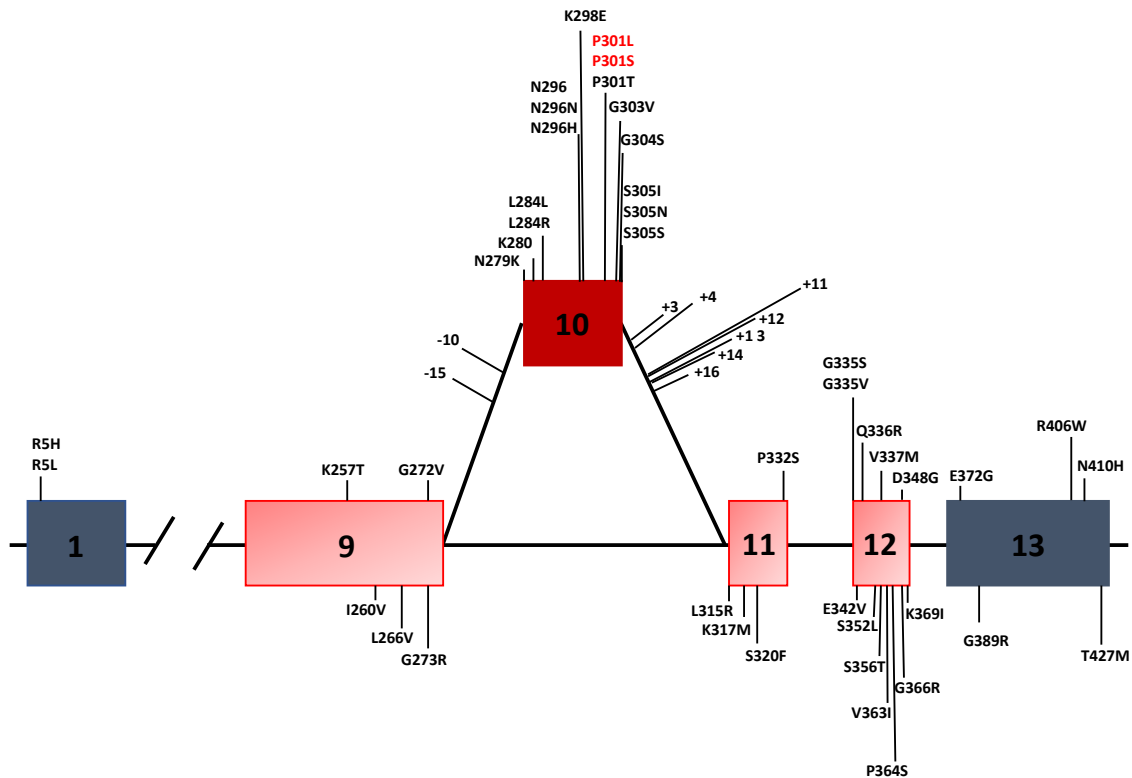


Figure 10 : Les Mutations du gène MAPT. Représentation schématique de la distribution des 53 mutations localisées sur le gène MAPT associées au développement des démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (FTDP-17). La plupart des mutations sont situées dans les régions codantes des exons 9 à 13. Quelques mutations sont retrouvées également dans les introns encadrant l'exon 10. *Modifié d'après (Ghetti et al., 2015).*

3.1.2 L'influence des haplotypes

D'autres événements se produisant au niveau du gène MAPT peuvent être associés au développement de tauopathies. L'inversion de 900 kb du génome comprenant un certain nombre de gènes, dont MAPT, définit deux haplotypes différents : H1 et H2. Il s'avère que l'haplotype H1 est associé à un risque accru de développer plusieurs tauopathies dont la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence cortico-basale (DCB) et la maladie d'Alzheimer (Baker *et al.*, 1999; Pittman *et al.*, 2005). L'implication de l'haplotype H1 dans le développement de ces pathologies a été étudiée dans plusieurs études. La transfection de plasmides rapporteurs constitués du gène codant pour la luciférase couplé au gène MAPT (haplotype H1 ou H2) montre que le promoteur de l'haplotype H1 permet une expression plus efficace du transcrit Tau comparé à l'haplotype H2 (Kwok *et al.*, 2004). Ces différences d'efficacité entre les deux haplotypes ont été associées à la présence de variant alléliques au niveau

de la région promotrice du gène MAPT (Rademakers *et al.*, 2005; Caillet-Boudin *et al.*, 2015).

3.1.3 D'autres altérations génétiques à l'origine des tauopathies

Certaines tauopathies ont pour origine des mutations génétiques ne touchant pas le gène codant pour la protéine Tau. C'est le cas notamment pour les démences familiales britanniques et danoises où des mutations de BRI2, un gène codant pour une protéine régulant le métabolisme de l'APP, ont été associées au développement de ces maladies (Tamayev *et al.*, 2010). On peut citer également la dystrophie myotonique qui est caractérisée par une expansion de triplets CUG au niveau de la région 3'UTR du gène DMPK (*dystrophy myotonic protein kinase*) codant pour la myotonine, une kinase cAMP dépendante. Cette tauopathie est particulièrement intéressante car elle est associée à l'épissage anormal des transcrits Tau. En effet, une altération de l'épissage alternatif des transcrits Tau a été observée au sein des neurones présentant une dégénérescence neurofibrillaire. Il a été mis en évidence une augmentation de l'exclusion des exons 2 et 3 et une variation du rapport des isoformes 3R/4R (Kiuchi *et al.*, 1991; Sergeant *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004). Cette altération de l'épissage pourrait résulter de la séquestration de certains facteurs d'épissage, tel que MBNL1, au sein des expansions de triplets CUG des transcrits DMPK (Brook *et al.*, 1992).

3.2 Les origines sporadiques des tauopathies

La plupart des tauopathies sont sporadiques. Certaines de ces pathologies peuvent résulter de phénomènes bien déterminés. Par exemple, les commotions cérébrales répétées notamment chez les boxeurs peuvent promouvoir l'apparition d'une tauopathie appelée : encéphalopathies traumatiques chroniques (Tokuda *et al.*, 1991). Toutefois, dans la plupart des cas, les événements à l'origine du développement des tauopathies restent obscurs. C'est notamment le cas pour la maladie d'Alzheimer (MA) bien que plusieurs facteurs de risques peuvent être associés au développement de cette pathologie. Par exemple, l'âge est le facteur de risque principal avec une prévalence de 15% après 80 ans. Il existe également des facteurs de risques environnementaux, tels que le tabac, l'alcool ou encore la pollution, le faible niveau

d'études, les troubles du sommeil, l'obésité... Certains gènes peuvent également influencer l'apparition de la MA. Parmi les facteurs de susceptibilité génétiques on peut citer le gène codant pour la protéine apolipoprotéine E (APOE), BIN 1 ou encore CLU (N. N. Chen *et al.*, 2012; Leboucher *et al.*, 2013; Reitz and Mayeux, 2014).

II. La maladie d'Alzheimer, une tauopathie pas comme les autres

La maladie d'Alzheimer est la plus fréquente des maladies neurodégénératives et à ce titre l'une des plus étudiées. D'ailleurs, elle représente à elle seule 60 % des cas de démences. C'est pourquoi nous accorderons une importance particulière à l'étude de cette pathologie.

1. Quelques dates historiques

Le neuropsychiatre Alois Alzheimer décrit, pour la première fois, en 1907 une nouvelle forme de démence chez une patiente nommée Auguste Deter. Cette patiente âgée de 51 ans présentait des troubles du comportement et une perte rapide de la mémoire. L'étude post-mortem a révélé une atrophie de son cerveau accompagnée d'une perte des neurones. Alois Alzheimer décrit également la présence d'enchevêtrements fibrillaires intracellulaires ainsi que des plaques neuritiques (Alzheimer *et al.*, 1995). Dans les années 1960, une association entre le nombre de plaques séniles au niveau du cortex cérébral et le déclin des fonctions intellectuelles a été reportée (Blessed, Tomlinson and Roth, 1968). C'est finalement dans les années 80 que différents travaux ont identifié la protéine Tau comme composant principal des lésions intra-neuronales appelées dégénérescence neurofibrillaires (DNF) (Brion, Couck and Dumnd, 1985; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Goedert *et al.*, 1988).

2. Aspect clinique

On peut diviser en 3 stades l'évolution clinique de la maladie d'Alzheimer. Le premier stade est caractérisé par une perte progressive de la mémoire avec l'incapacité à acquérir de nouvelles informations. Arrive ensuite le stade modéré où d'autres difficultés apparaissent, comme l'apraxie (difficultés à se mouvoir), l'aphasie (troubles du langage) ou encore l'agnosie (troubles de la reconnaissance d'objets). Ce stade

correspond à la période la plus longue de la maladie et peut durer plusieurs années. Au cours du dernier stade, les symptômes précédents s'intensifient, une démence s'installe et le patient se dirige vers une perte totale d'autonomie. On parle dans ce cas de stade sévère.

3. Aspect neuropathologique

L'étude neuropathologique de patients atteints de la maladie d'Alzheimer a révélé que le volume général du cerveau est diminué. Bien que cette atrophie du tissu cérébral soit localisée sur l'ensemble des régions du cortex, elle n'est cependant pas homogène. En effet, l'atrophie prédomine au niveau du cortex enthorhinal et de l'hippocampe (West *et al.*, 1994; Whitwell *et al.*, 2008). Il a été reporté également qu'une dilatation modérée des ventricules est associée à la perte du volume du cortex (Hubbard and Anderson, 1981) (Figure 11).

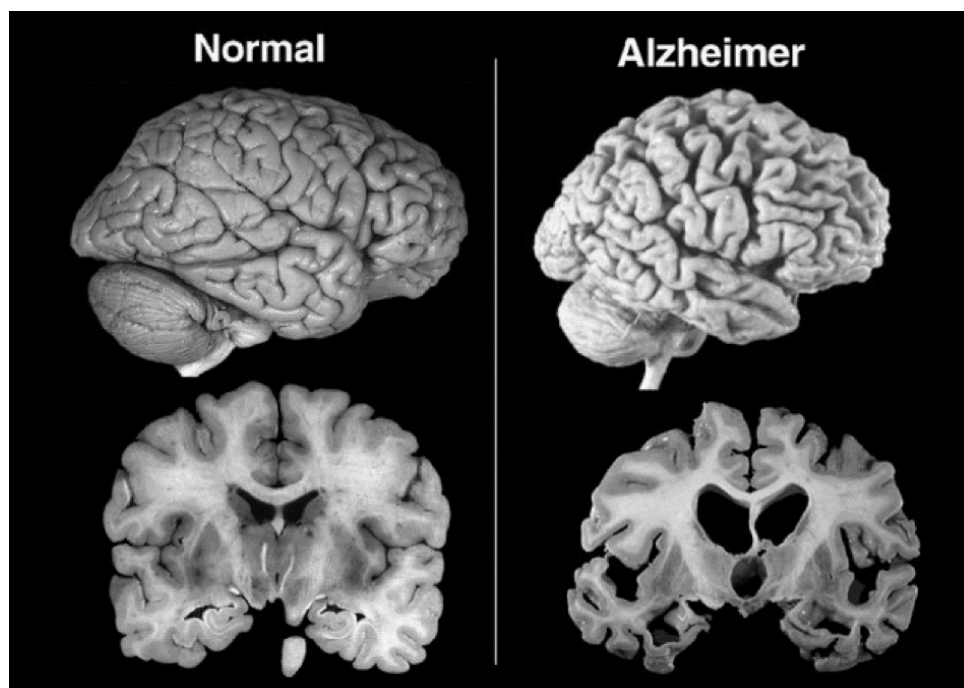


Figure 11 : Atrophie du cerveau chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Photographies de cerveaux entiers ou coupés transversalement. On peut voir que le cerveau Alzheimer (photos de droite) présente une atrophie marquée et une dilatation des ventricules comparé au cerveau contrôle (à gauche) (source : <http://segredosdomundo.r7.com/wp-content/uploads/2015/10/1021.jpg>).

Ces modifications macroscopiques ne permettent pas à elle seules de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer. Des examens microscopiques du cerveaux doivent y être associés afin de valider le diagnostic.

4. Aspect histologique

L'étude microscopique des tissus Alzheimer a permis de mettre en évidence deux lésions caractéristiques de la pathologie. On distingue les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire (Figure 12). L'association entre l'agrégation des peptides bêta-amyloïdes au niveau extracellulaire et l'agrégation des protéines Tau au niveau intracellulaire forme ce que l'on appelle les plaques séniles.

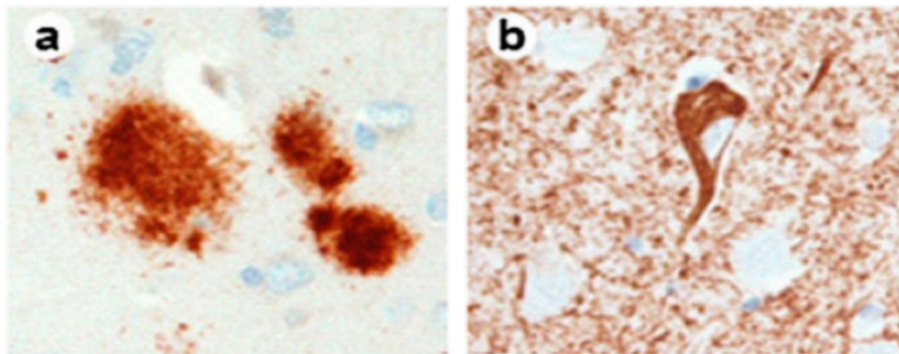


Figure 12 : Lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. A) Les lésions extracellulaires sont composées des plaques amyloïdes, révélées ici par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-Abeta. **B)** La dégénérescence neurofibrillaire est une lésion intracellulaire. Elle est constituée de l'agrégation des protéines Tau, révélée à l'aide d'un anticorps anti-Tau phosphorylée par immunohistochimie. *Modifié d'après (Murray et al., 2014).*

4.1 Les dépôts amyloïdes

Les dépôts amyloïdes sont des lésions extracellulaires. Elles sont formées suite à l'accumulation de deux peptides bêta-amyloïde différents : A β 40 et A β 42 constitués respectivement de 40 et 42 acides aminés. Ces peptides sont issus du clivage d'une protéine transmembranaire appelée APP (protéine précurseur de l'amyloïde). On distingue deux voies de clivage de ce précurseur, une voie dite non-amyloïdogénique qui concerne le clivage physiologique de l'APP et une autre voie amyloïdogénique (Figure 13).

Le clivage physiologique de l'APP est effectué par l'action de l' α -sécrétase dans un premier temps puis de la γ -sécrétase. Le premier clivage libère les peptides sAPP α , connus pour être neuroprotecteur, et C83. Ce dernier est alors clivé à son tour générant deux autres peptides : l'AICD et p3. Au cours de la voie amyloïdogénique, le premier clivage est effectué par la β -sécrétase libérant les peptides sAPP β et C99. Le peptide C99 peut ensuite être clivé par la γ -sécrétase générant le peptide AICD et A β (Zheng and Koo, 2011). La production du peptide A β n'est pas forcément associée au développement de la maladie. En effet, le peptide peut ne pas s'agréger sous forme amyloïde. L'agrégation du peptide A β peut résulter de divers événements. Des mutations au niveau de l'APP, des modifications dans l'activité des sécrétases ou encore un défaut de sa dégradation peuvent promouvoir son accumulation et ainsi favoriser son agrégation (Bharadwaj *et al.*, 2009).

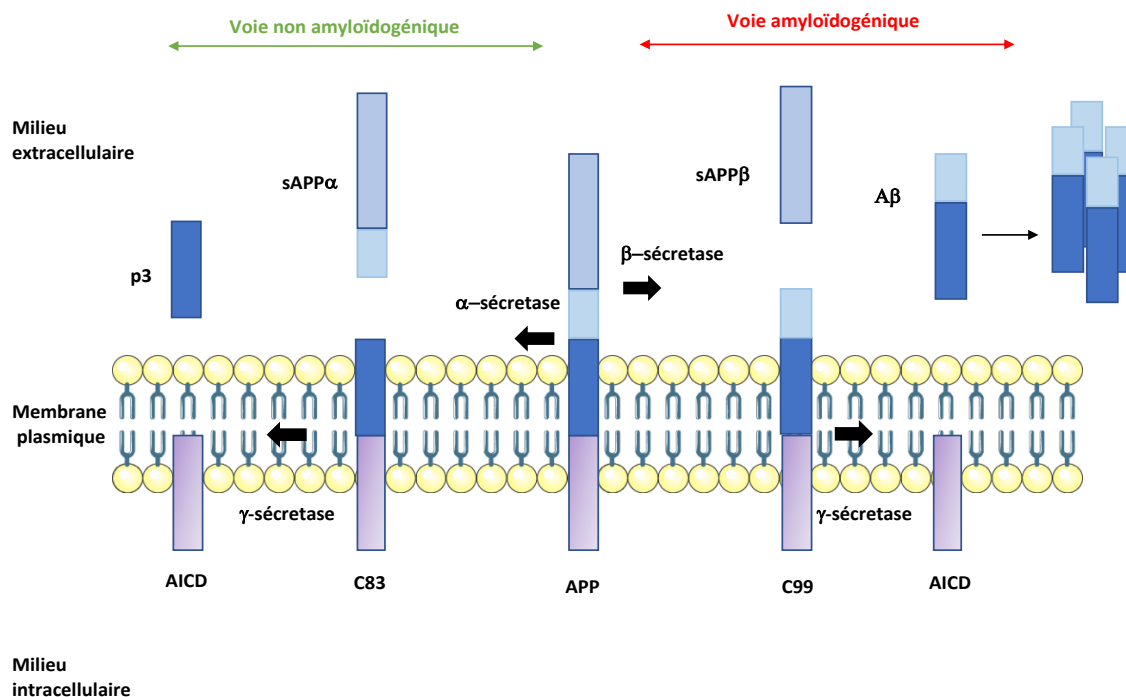


Figure 13 : Représentation schématique du métabolisme de l'APP. La voie amyloïdogénique génère divers fragments dont le peptide A β dans le compartiment extracellulaire. Ce peptide a la capacité de s'agréger sous la forme de plaques amyloïdes lors de la maladie d'Alzheimer.

4.2 Les dégénérescences neurofibrillaires

L'étude au microscope électronique des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) a permis de caractériser la structure de ces lésions. Elles se présentent principalement sous la forme de filaments hélicoïdaux appariés ou PHF (*paired helicoïdal fibrils*) (Kidd, 1963). Plus tard, il a été déterminé que la protéine Tau est le principal composant de ces lésions où elle est présente sous une forme hyper et anormalement phosphorylée (Brion, Couck and Dumnd, 1985; Grundke-Iqbal *et al.*, 1987).

Les DNF sont présentes de manière physiologique chez les personnes de plus de 50 ans. Toutefois, cette accumulation est beaucoup plus faible par rapport à celle observée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les DNF des personnes en bonne santé se concentrent au niveau de l'hippocampe. Concernant les patients, les DNF envahissent progressivement les autres régions du cortex. Cette propagation des lésions Tau se fait de façon stéréotypée. En 1991, il a été défini 6 stades d'évolution de la pathologie, selon la progression des DNF dans le cortex. Dans un premier temps, les DNF sont présents au niveau du cortex enthorinal (stades I et II) puis ils se propagent vers l'hippocampe (stades III, IV) avant d'atteindre les aires associatives du néocortex (stades V et VI) (Braak and Braak, 1991). Il a été finalement établi que cette propagation des DNF est corrélée avec le niveau de sévérité de la pathologie (Arriagada *et al.*, 1992). Une autre classification de la propagation des lésions Tau a ensuite été proposée, prenant en compte cette fois-ci les signes cliniques associés à la propagation de la pathologie permettant ainsi d'affiner la caractérisation préexistante (Delacourte *et al.*, 1999) (Figure 14).

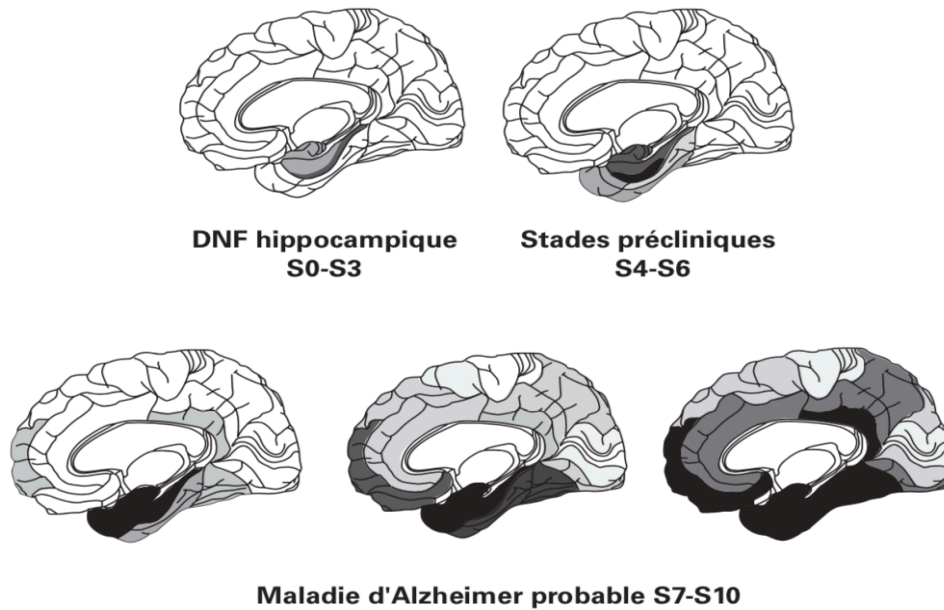


Figure 14 : Propagation progressive et hiérarchisée de la dégénérescence neurofibrillaire. La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) débute au niveau de l'hippocampe (S0 à S3) puis elle se propage dans les régions temporales (S4 à S6). Les lésions apparaissent finalement dans les aires associatives et dans les stades les plus avancés, elles touchent l'ensemble des aires corticales (S7-S10) (Buée and Delacourte, 2006).

Plusieurs études ont été effectuées afin de comprendre l'évolution spatio-temporelle de la pathologie. Actuellement, l'hypothèse la plus répandue est que la protéine Tau pathologique adopterait un comportement comparable aux protéines de type prion. Dans les maladies à prion, les protéines prions mal-conformées et agrégées se propagent à travers les différentes régions du cerveau par une propagation de cellule en cellule. Les agrégats pathologiques, une fois entrés dans les cellules saines, peuvent alors transformer des protéines prion saines en protéines mal conformées et les recruter au sein des agrégats (Fraser, 2014; Guo, Noble and Hanger, 2017). Une propagation des agrégats Tau à l'image de celle observée dans les maladies de type prion a été suggérée dès la fin du vingtième siècle. En effet, une étude a mis en évidence que l'incubation de PHF, extraits à partir de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, dans des cultures primaires de neurones provenant de fœtus humains entraîne la formation de PHF (De Boni & Crapper, 1978). Plus récemment, l'injection de lysats murins contenant des agrégats Tau dans des souris surexprimant la protéine Tau physiologique humaine a renforcé l'idée d'une propagation des agrégats. En effet, les protéines Tau humaines non mutées s'agrègent après l'injection de ce lysat. De plus, cette agrégation n'est pas limitée au site d'injection mais se

propage dans d'autres régions cérébrales (Clavaguera *et al.*, 2009). Plus récemment, ces travaux ont été confirmés par l'injection de lysats provenant de cerveaux Alzheimer dans l'hippocampe de souris wild-type (Lasagna-reeves *et al.*, 2012). De la même façon, l'injection cérébrale chez le rat de vecteurs lentiviraux codant pour la Tau humaine wild-type ou mutée a mis en évidence la pathologie Tau au niveau du site d'injection et sa propagation à travers des régions cérébrales voisines ou plus éloignées (Dujardin *et al.*, 2014).

III. Les mécanismes d'agrégation de la protéine Tau

L'agrégation des protéines Tau est observée dans l'ensemble des tauopathies. A ce jour, les mécanismes à l'origine de ce phénomène ne sont pas encore clairement déterminés. De nombreuses études ont été effectuées afin de comprendre comment et pourquoi les protéines Tau s'agrègent sous la forme de structures fibrillaires.

1. Comment s'agrègent les protéines Tau ?

En condition pathologique, il semble se produire un changement de conformation secondaire de Tau favorisant son agrégation (Berriman *et al.*, 2003). En effet, les protéines Tau retrouvées sous forme agrégée présentent une proportion en structures β largement supérieure aux protéines Tau solubles. Tau est décrite comme étant une protéine très soluble, bien qu'elle possède deux motifs ayant un caractère agrégatif. Ces deux motifs, ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹, sont localisés respectivement dans le premier et le troisième domaine de liaison aux microtubules de Tau. Ils sont suffisants pour s'auto-agrégier *in vitro* en l'absence de stimulus chimique (von Bergen *et al.*, 2000; Von Bergen *et al.*, 2001). Il semblerait que l'implication de ces motifs dans l'agrégation résulterait de leur tendance à former des structures en feuillets β (Mukrasch *et al.*, 2007, 2009). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement des variations de conformation secondaire des protéines Tau renforce l'idée qu'un changement de conformation de Tau se produit lors de son agrégation. Par exemple, l'anticorps MC-1 peut être utilisé pour identifier les protéines Tau agrégées. Cet anticorps possède la capacité d'interagir avec un épitope résultant de la liaison entre le domaine N-terminal de Tau avec son domaine de liaison aux microtubules (Jicha *et al.*, 1997).

Cette agrégation des protéines Tau est un mécanisme lent pouvant être divisé en plusieurs étapes (Figure 15). Dans un premier temps les protéines Tau sont recrutées sous forme de dimères. Ces derniers s'assemblent ensuite afin de générer des oligomères. Il est intéressant de noter cette étape peut être accélérée en présence de polyanions, tels que l'héparine ou les ARN (Goedert *et al.*, 1996). Il a été admis que le centre des oligomères est constitué des domaines de liaison aux microtubules des protéines Tau tandis que les extrémités N-terminales et C-terminales resteraient en périphérie. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les protéines Tau peuvent s'agréger via l'interaction de leurs motifs ²⁷⁵VQIINK²⁸⁰ et ³⁰⁶VQIVYK³¹¹ situés au niveau de leurs domaines de liaison aux microtubules (Peterson *et al.*, 2008). Les oligomères seraient ensuite capables de recruter d'autres protéines Tau sous forme monomérique jusqu'à la formation de fibres insolubles (Kuret *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2006) (Figure 15). Dans la maladie d'Alzheimer ces fibres s'apparient sous la forme d'hélices (PHF) (Kidd, 1963). Parfois, des filaments droits peuvent également être retrouvés en complément des PHF (Crowther, 1991). Récemment, une étude a identifié deux nouvelles structures des filaments Tau chez les patients atteints de la maladie de Pick grâce à l'utilisation de cryo-microscopie électronique. Il y a les filaments « fins » (NPF pour le terme anglais *Narrow Pick filaments*) et les filaments « épais » (WPF pour *wide Pick filaments*). Les filaments fins sont constitués d'un seul protofilament torsadé sur lui-même tandis que les WPF résultent de l'association de deux filaments fins reliés par leur extrémité distale (Falcon *et al.*, 2018).

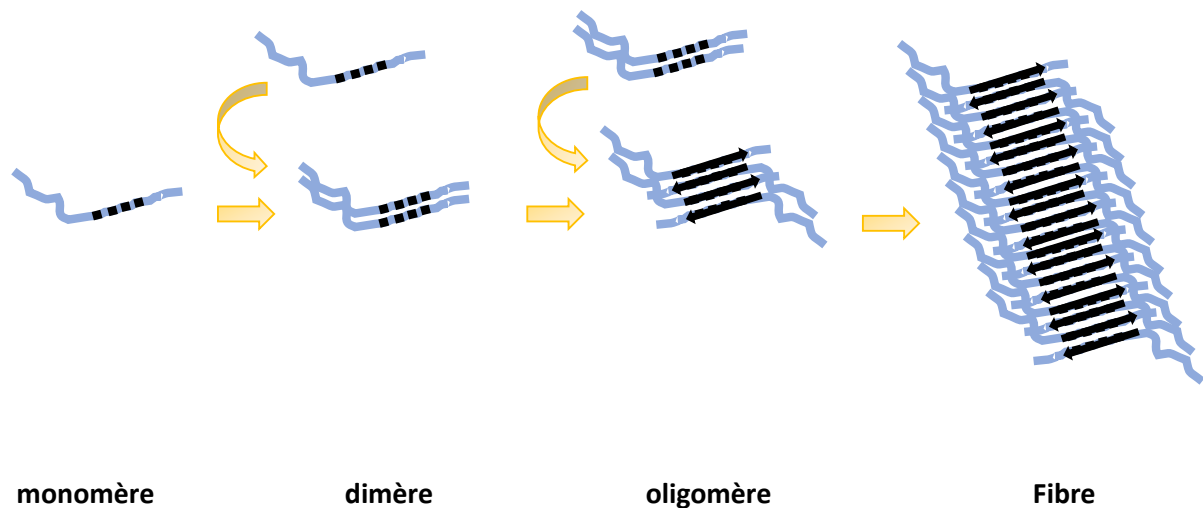


Figure 15 : Modèle d'agrégation des protéines Tau. Au cours de l'agrégation, les monomères de Tau s'associent en dimères puis en oligomères. Ces oligomères sont capables de recruter d'autres protéines Tau formant à terme des fibres insolubles très structurées. Les domaines de liaison aux microtubules des protéines Tau (comportant les motifs pro-agrégants VQIINK et VQIVYK) se retrouvent au centre des fibres, arrangés en feuillets beta parallèles tandis que les domaines N- et C- terminaux des protéines Tau restent en périphérie (Cowan and Mudher, 2013).

2. Pourquoi les protéines Tau s'agrègent ?

Les mécanismes à l'origine de l'agrégation des protéines Tau ne sont pas encore clairement définis mais il semblerait que certaines modifications post-traductionnelles de Tau peuvent activer ce processus.

2.1 Implication de la phosphorylation de Tau

Les tauopathies sont caractérisées par une phosphorylation exacerbée et anormale des protéines Tau (Bancher *et al.*, 1989). D'ailleurs, l'étude par électrophorèse deux dimensions a révélé que la Tau provenant de cerveaux de patients, atteints de différentes tauopathies, est phosphorylée de façon plus importante que celle des cerveaux témoins (Sergeant *et al.*, 1995). Cette hyperphosphorylation se traduit par une augmentation du nombre de sites phosphorylés pour une protéine tandis que la phosphorylation anormale reflète la phosphorylation d'un site uniquement en condition pathologique (Hanger *et al.*, 2002). De plus, il a été estimé qu'en condition physiologique la protéine Tau est phosphorylée à raison de 2 ou 3 groupements phosphate par molécule tandis que 3 voire 4 fois plus de groupements sont observés

dans les cerveaux Alzheimer (Ksiezak-Reding, Liu and Yen, 1992; Kopke *et al.*, 1993). Ces sites de phosphorylations anormaux se concentrent au niveau de régions particulières de la protéine Tau. Ils se situent essentiellement au niveau de son domaine riche en proline ainsi qu'au niveau de son domaine C-terminal (Noble *et al.*, 2013). Pour expliquer cette hyperphosphorylation des protéines Tau dans les tauopathies, une altération de l'activité des kinases et des phosphatases a été suggérée. Plusieurs études ont été effectuées afin de comprendre le rôle des kinases dans le développement des tauopathies. Il a été démontré que l'incubation *in vitro* de protéines Tau recombinantes avec différentes kinases, telles que cdk5, GSK-3 β ou PKA, induit la phosphorylation de cette dernière et favorise son agrégation sous la forme de PHF (Wang, Grundke-Iqbal and Iqbal, 2007). De plus, une colocalisation entre les kinases cdk5 et les PHF a été observée au niveau de l'hippocampe à des stades précoces de développement de la maladie d'Alzheimer (Pei *et al.*, 1998). Une autre étude a révélé que l'hyperphosphorylation de Tau suite à la surexpression de la kinase GSK-3 β , dans un modèle murin de tauopathie, est associée à des troubles mnésiques (Lucas *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2002). Concernant l'étude des phosphatases, il a été mis en évidence que la principale phosphatase de Tau, PP2A, est diminuée de 30% dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Gong *et al.*, 1995). Dans l'ensemble ces résultats renforcent l'idée d'une hyperphosphorylation de Tau en condition pathologique (Figure 16).

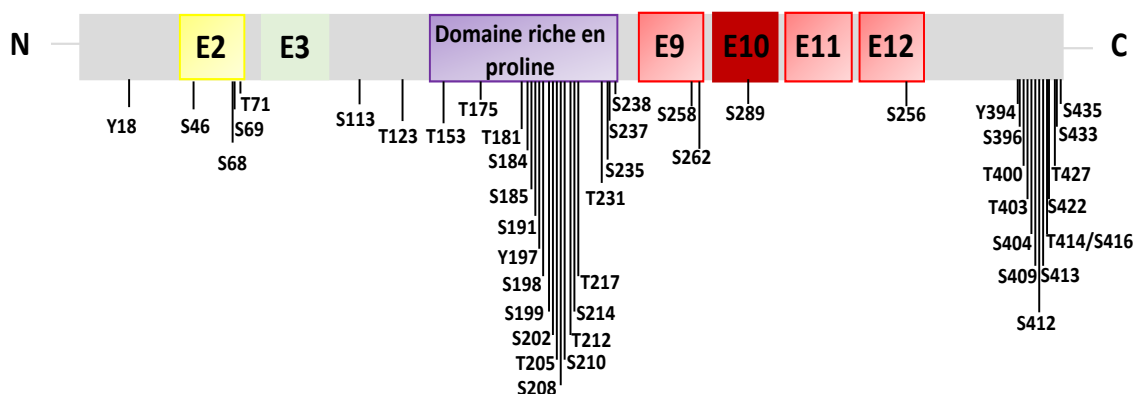


Figure 16 : Représentation schématique des sites de phosphorylation pathologiques des protéines Tau. Positionnement relative des 45 sites de phosphorylation identifiés à partir de protéines Tau extraites de cerveaux Alzheimer. Les sites sont essentiellement situés au niveau du domaine riche en proline de Tau. *Modifié d'après* (Noble *et al.*, 2013).

Ainsi, le niveau de phosphorylation des protéines Tau semble être une modification post-traductionnelle importante dans la mise en place de la pathologie. Plusieurs études s'accordent à dire que cette modification pourrait être à l'origine de son agrégation. La protéine Tau agrégée se retrouve systématiquement hyperphosphorylée chez les patients atteints d'une tauopathie et dans des modèles murins transgéniques (Wang and Mandelkow, 2016). Par ailleurs, une augmentation du niveau de phosphorylation de Tau est observée en amont de son agrégation (Baner et al., 1989; Braak, Braak and Mandelkow, 1994). Ces résultats ont été confirmés quelques années plus tard lorsque l'isolation de protéines Tau anormalement phosphorylées, provenant de cerveaux humains Alzheimer, a démontré que cette dernière initie son agrégation sous forme de PHF *in vitro* (Alonso et al., 2001). Néanmoins, certaines études ont nuancé l'importance de la phosphorylation dans les mécanismes d'agrégation de Tau. En effet, la phosphorylation de certains sites peut s'avérer protecteur contre l'agrégation de Tau (Schneider et al., 1999). In vivo, l'hyperphosphorylation des protéines Tau mais pas son agrégation a été constatée au cours de l'hibernation d'animaux ou lors d'anesthésies (Planel et al., 2007). Ces résultats suggèrent que l'hyperphosphorylation de Tau n'est peut-être pas le seul événement à l'origine de son agrégation. Le niveau de phosphorylation de Tau pourrait, de ce fait, agir comme un accélérateur indirect de son agrégation. En effet, le niveau de phosphorylation de Tau est connu pour moduler son interaction avec les microtubules augmentant, de ce fait, le pool de protéines Tau libres.

2.2 Les autres modifications post-traductionnelles

La phosphorylation n'est certainement pas la seule modification post-traductionnelle de Tau impliquée dans son agrégation. D'ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence l'importance d'autres modifications post-traductionnelles dans ce phénomène.

2.2.1 L'acétylation de Tau dans les tauopathies

L'acétylation de différents sites de Tau tels que la Lys259, Lys290, Lys321, Lys353 est significativement réduite dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer en comparaison à des sujets contrôles (Cook, Carlomagno, et al., 2014).

Au contraire, l'acétylation au niveau de la lysine 280 a été détectée chez les patients atteints d'Alzheimer et dans d'autres tauopathies (Irwin *et al.*, 2013). Cette modification est également associée à la formation de feuillets beta, connue pour favoriser l'agrégation de Tau (Von Bergen *et al.*, 2001). Plus récemment, l'acétylation du résidu lysine 174 des protéines Tau a été identifiée dans des cerveaux humains Alzheimer et associée à une accumulation de Tau dans ces conditions (Min *et al.*, 2015).

2.2.2 La troncation de Tau dans les tauopathies

Plusieurs fragments de Tau ont été identifiés également dans les PHF de patients atteints d'Alzheimer et dans d'autres tauopathies (Wischnik *et al.*, 1988). L'étude de tissus post-mortem de patients atteints d'Alzheimer montre la présence de marqueurs de caspases actives à proximité des PHF (Rohn *et al.*, 2001). D'autres travaux ont mis en évidence que la Tau pleine taille peut être clivée par l'action de la caspase 3 au niveau du résidu acide aspartique 421 générant une Tau tronquée de 421 acides aminés. Il a été démontré que cette Tau tronquée favorise la formation d'agrégats dans un modèle murin de tauopathies. De façon intéressante, les auteurs mettent en évidence que le clivage des protéines Tau par les caspases précède la formation des PHF (De Calignon *et al.*, 2010). D'autres études ont démontré que la protéine Tau peut être clivée par une endopeptidase asparagine (AEP) connue pour avoir une activité accrue au cours du vieillissement et chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En effet, cette endopeptidase peut cliver Tau *in vitro* au niveau des résidus asparagine 255 et 368. D'ailleurs, la présence de protéines Tau tronquées au niveau du résidu 368 a été observée dans des cerveaux Alzheimer (Zhang *et al.*, 2014).

Par conséquent, la phosphorylation anormale semble être un événement majeur dans l'agrégation des protéines Tau bien que d'autres modifications post-traductionnelles semblent détenir une importance particulière dans la mise en place de la pathologie.

IV. Quelles sont les conséquences fonctionnelles de la pathologie Tau ?

Les tauopathies sont caractérisées par une agrégation des protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées sous la forme de filaments insolubles. La formation de ces agrégats aboutit au dysfonctionnement des mécanismes régulés par Tau au sein des neurones (Figure 17). Plusieurs hypothèses existent afin d'expliquer la toxicité de l'agrégation des protéines Tau. Cette toxicité pourrait résulter d'une perte de fonction des protéines Tau physiologiques et/ou d'un gain de fonction toxique des protéines Tau pathologiques.

1. Gain de fonction toxique de Tau

Au cours du processus d'agrégation, les monomères de Tau s'associent en dimères puis en oligomères solubles jusqu'à la formation d'agrégats insolubles de Tau sous la forme de PHF menant à la dégénérescence des neurones (Cowan and Mudher, 2013). De nombreuses études ont été effectuées afin d'identifier parmi les différentes formes que Tau peut adopter lors de son agrégation, celles réellement toxiques pour le fonctionnement des cellules. Parmi ces études, un grand nombre ont montré, à partir de différents modèles de tauopathies, que la formation des agrégats se produit après l'apparition des troubles cognitifs (Santacruz *et al.*, 2005; Le Corre *et al.*, 2006; Yoshiyama *et al.*, 2007). Par ailleurs, une dégénérescence progressive des neurones peut subvenir malgré l'absence de PHF, dans un modèle de tauopathies chez la drosophile (Wittmann *et al.*, 2001). Ce même phénomène a été constaté chez l'homme ainsi que dans des modèles murins (Gomez-Isla *et al.*, 1997). Ces résultats permettent de suggérer que les agrégats insolubles de Tau ne sont finalement pas nécessairement toxiques tandis que certaines formes solubles de Tau peuvent s'avérer être néfastes pour le fonctionnement des cellules. Les agrégats insolubles de Tau pourraient finalement être des structures inertes pouvant capturer les formes toxiques de Tau bien que, à terme, ils entraînent un dysfonctionnement dans la physiologie des cellules.

1.1 Impact des formes toxiques dans les mécanismes régulés par Tau

En condition pathologique, le réseau microtubulaire est déstabilisé suite au détachement des protéines Tau hyper et anormalement phosphorylées (Alonso *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007). Il résulte de ce phénomène une altération des fonctions importantes pour le bon fonctionnement des cellules, telle qu'une perturbation du transport axonal ou de la transmission synaptique (Trojanowski and Lee, 2005). D'ailleurs, un dysfonctionnement de ces mécanismes est observé de façon précoce dans plusieurs tauopathies (Terry *et al.*, 1991; Stokin *et al.*, 2005). Une altération de la localisation des mitochondries a été constatée également dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Kopeikina *et al.*, 2011). Les auteurs suggèrent que l'accumulation de ces organites au niveau du corps cellulaire pourrait être en partie responsable du dysfonctionnement de la transmission synaptique observée en condition pathologique. En effet, les mitochondries sont normalement transportées le long des microtubules au niveau des axones afin de participer à la transduction des signaux synaptiques (Mattson, Gleichmann and Cheng, 2008). Une autre étude a associé l'hyperphosphorylation de Tau, induite par l'inhibition des phosphatases PP2A dans un modèle de lignée cellulaire, avec une altération du transport axonal (Yang *et al.*, 2007). De façon intéressante, cette étude révèle que l'hyperphosphorylation de Tau n'induit pas seulement des dysfonctionnements dans le transport des organites mais est également responsable d'une dégénérescence des cellules (Yang *et al.*, 2007).

1.2 Dysfonctionnement du métabolisme des ARN

De plus en plus d'études tendent à démontrer un lien entre la pathologie Tau et le métabolisme des ARN. Une altération de la synthèse des protéines a été mise en évidence dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Langstrom *et al.*, 1989). Quelques années plus tard, ces résultats ont été confirmés à des stades précoces de la pathologie et ont été associés à une diminution de l'activité des ribosomes (Ding *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que Tau est capable d'interagir avec les ribosomes et que cette interaction est renforcée dans les tauopathies (Papazosomenos and Binder, 1987; Piao *et al.*, 2002). Plus récemment, ce renforcement de l'interaction entre Tau et les ribosomes en condition pathologique a

été associé à une inhibition de la traduction des protéines (Meier *et al.*, 2016). L'effet de Tau sur la traduction pourrait donc jouer un rôle dans le développement des tauopathies d'autant plus la synthèse protéique est un phénomène majeur pour le bon fonctionnement des phénomènes de mémorisation (Duvarci, Nader and Ledoux, 2008).

Par ailleurs, une colocalisation entre les agrégats insolubles de Tau et des protéines liant les ARN (TIA1, TDP-43, FUS, EWSR1 et DDX5) a été mise en évidence dans un modèle murin transgénique modulant la pathologie Tau (Vanderweyde *et al.*, 2012, 2017). Le rôle de ces différentes protéines dans la régulation du métabolisme des ARN permet de suggérer un dysfonctionnement de ces mécanismes dans les tauopathies. De plus, la mutation de plusieurs protéines liant les ARN est associée au développement de différentes maladies neurodégénératives (Ash *et al.*, 2014). Récemment, des expériences menées à partir d'un modèle murin de tauopathies ont révélé que l'inhibition de l'expression de TIA1, une protéine impliquée dans la formation des granules de stress, protège contre la perte neuronale observée dans ce modèle et diminue l'accumulation des oligomères de Tau (Vanderweyde *et al.*, 2017; Apicco *et al.*, 2018).

2. Une perte de fonction de Tau

La toxicité pourrait également résulter d'une perte de fonction des protéines Tau. L'agrégation de cette dernière, entraînerait une diminution du pool de protéines Tau encore fonctionnelles pouvant, de ce fait, conduire au dysfonctionnement des cellules. D'ailleurs, les agrégats sont également composés de protéines Tau normales et d'autres MAPs comme MAP1 et MAP2 (Alonso, Grundke-Iqbal and Iqbal, 1996; Alonso *et al.*, 1997). Cette perte de fonction des protéines Tau en condition pathologique ne semble pas altérer uniquement la stabilité des microtubules (Alonso *et al.*, 1994) mais également d'autres mécanismes comme, par exemple, la protection des acides nucléiques.

En effet, une accumulation de dommages aux acides nucléiques a été observée dans un modèle murin de tauopathies (Violet *et al.*, 2015). De plus, il a été démontré *in vitro* que la phosphorylation de la protéine Tau au niveau de certains sites abolit sa capacité

à interagir avec l'ADN (Hua and He, 2003; Qi *et al.*, 2015). D'autres travaux ont révélé une incapacité de la Tau phosphorylée à protéger l'ADN *in vitro* en condition de stress oxydant (Lu *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que le stress oxydant semble jouer un rôle majeur dans la mise en place de la pathologie. En effet, une augmentation du stress oxydant est observée précocement dans plusieurs tauopathies au niveau de régions cérébrales touchées par les lésions (Komori *et al.*, 1998; Nunomura *et al.*, 2001; Albers *et al.*, 2002). D'ailleurs, une accumulation de dommages oxydatifs aux ARN et à l'ADN a été constatée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Wang, Markesbery and Lovell, 2006; Nunomura *et al.*, 2012).

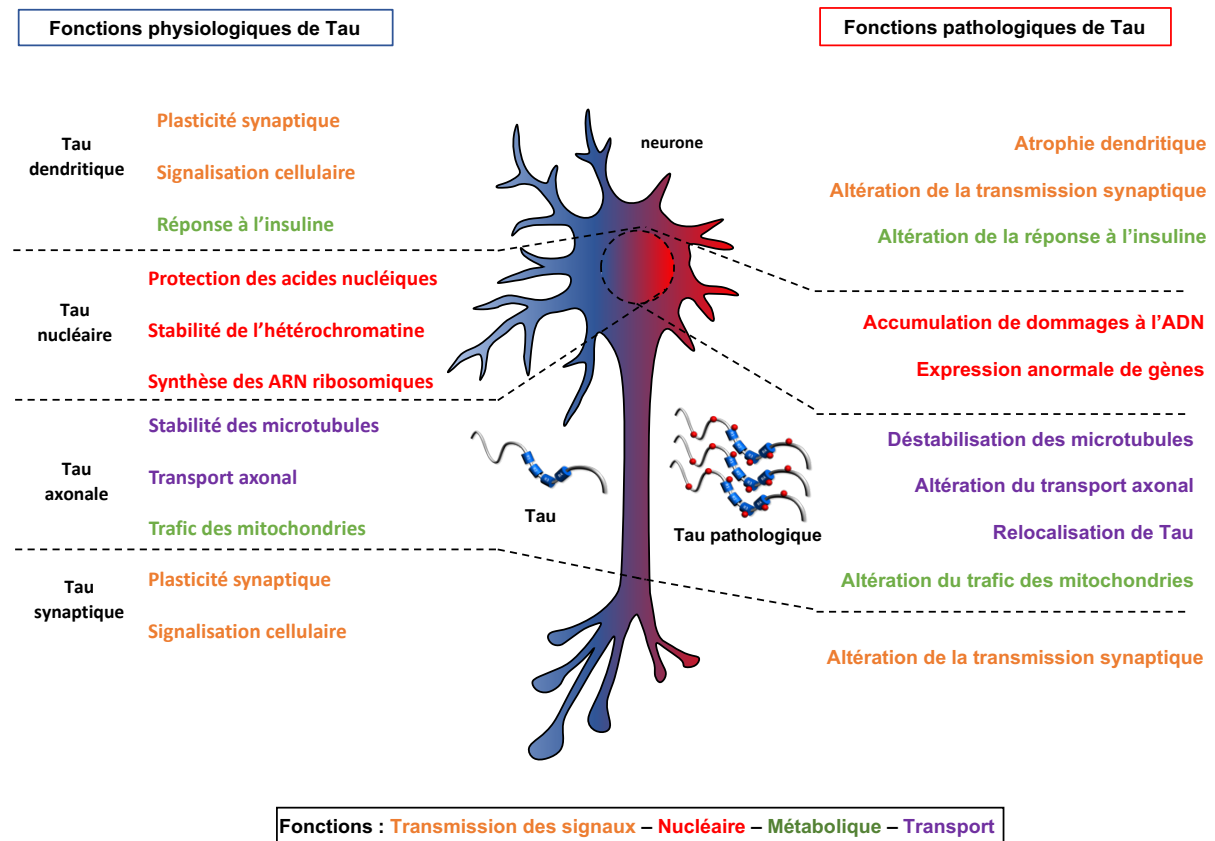


Figure 17 : Schéma récapitulatif des fonctions de Tau altérées au cours des tauopathies. Au cours des tauopathies, les fonctions régulées par les protéines Tau se retrouvent altérées. On constate un dysfonctionnement de la transmission synaptique, des troubles métaboliques (altération de la réponse à l'insuline et du trafic des mitochondries), des dysfonctions du transport axonal (déstabilisation des microtubules, relocalisation de Tau). Des altérations nucléaires sont également observées avec une accumulation de dommages à l'ADN et l'expression anormale de certains gènes. *Modifié d'après* (Albert *et al.*, 2018 en préparation)

Chapitre 3 : L'ARN hélicase DDX5

Au cours de ce chapitre, nous nous intéresserons à l'ARN hélicase à boîte DEAD DDX5 (p68) ainsi que son partenaire, l'hélicase DDX17 (p72). Nous étudierons la structure et la localisation de ces protéines ainsi que leurs rôles dans le métabolisme des ARN. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'implication de DDX5 dans la dégradation des ARNm par la voie NMD.

I. Quelques généralités sur les ARN hélicases à boîte DEAD

Les hélicases (ADN et ARN) sont divisées en six superfamilles (SFs) en fonction de leur séquence primaire d'acides aminés, de leur structure et de leur activité cellulaire (Singleton, Dillingham and Wigley, 2007). Ces superfamilles sont elles-mêmes divisées en différentes familles d'hélicases. Les ARN hélicases sont retrouvées dans les superfamilles SF1 et SF2 (Jankowsky, 2011). Les membres de la superfamille des hélicases SF2 ont pour caractéristiques de se déplacer sur l'ARN simple ou double-brin, aussi bien dans le sens 5'→3' que dans le sens 3'→5' tandis que les ARN hélicases de la superfamille SF1 ne se déplacent que dans un seul sens (Rozen *et al.*, 1990). Les ARN hélicases à boîte DEAD appartiennent à la superfamille SF2 (Figure 18). Elles sont présentes dans de nombreux organismes : des bactéries à l'homme en passant par les virus.

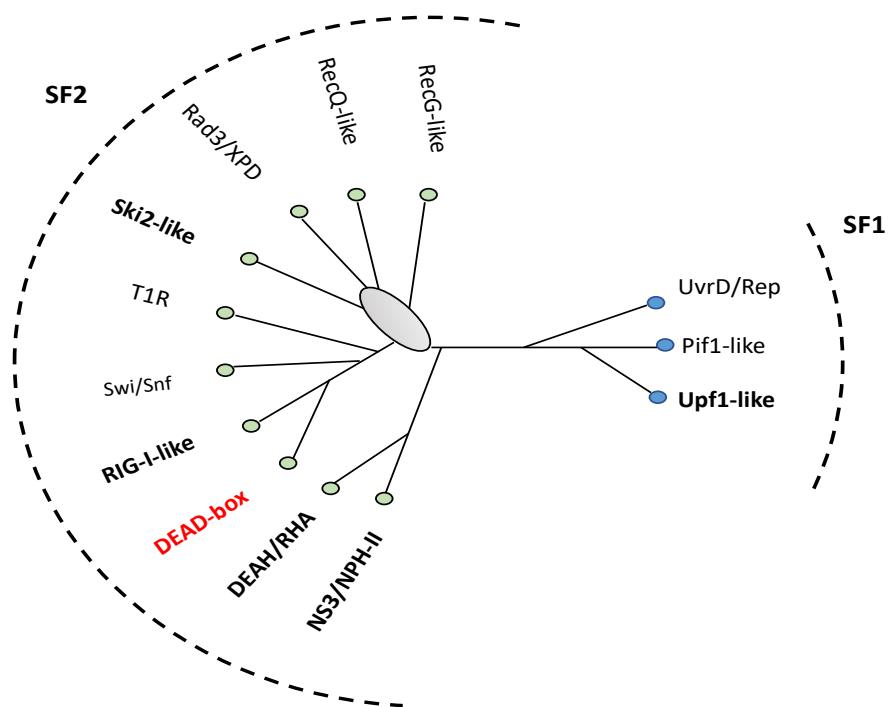


Figure 18 : Cladogramme des superfamilles SF1 et SF2. Les superfamilles d'hélicases SF1 sont représentées à droite et les SF2 à gauche du cladogramme. Les noms en gras représentent les superfamilles contenant des hélicases à ARN. L'ovale indique qu'il existe une incertitude dans la topologie du cladogramme au niveau de cette région. Les ARN hélicases à boîte DEAD sont annotées en rouge. (Jankowsky, 2011).

1. Remodelage des acides nucléiques par les ARN hélicases à boîte DEAD

Les ARN hélicases à boîte DEAD sont capables de lier et d'hydrolyser l'ATP afin de remodeler les structures secondaires et les complexes ribonucléoprotéiques formés par les ARN. L'utilisation de l'ATP par ces hélicases diffère des autres familles d'hélicases. Habituellement, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP par les ARN hélicases sont des étapes primordiales pour le remodelage des acides nucléiques. Chez les ARN hélicases à boîte DEAD, le déroulement des deux brins d'ARN nécessite uniquement la liaison de l'ATP ; l'hydrolyse de l'ATP est quant à elle utilisée pour l'étape de relargage de l'hélicase après la séparation des deux brins (Liu, Putnam and Jankowsky, 2008). En fonction des conditions physiologiques et/ou du substrat, deux types différents de remodelage des acides nucléiques ont été identifiés. Il y a l'hydrolyse dite « productive » lorsque l'ouverture des deux brins d'ARN est maintenue malgré le départ de l'hélicase.

Cet événement est à discerner de l'hydrolyse « futile » où les deux brins se referment après le passage de l'hélicase (Linder and Jankowsky, 2011).

2. Structure des ARN hélicases à boîte DEAD

Les ARN hélicases à boîte DEAD sont composées d'un cœur hélicase très conservé constitué de deux domaines. Au sein de ces deux domaines, on retrouve 12 motifs d'acides aminés conservés au niveau de leur séquence et de leur position. Ces motifs sont impliqués dans différentes fonctions telles que la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ainsi que la liaison à l'ARN. Des communications peuvent avoir lieu entre les différents motifs au cours de l'interaction des hélicases avec l'ATP ou l'ARN (Figure 19).

2.1 Les motifs impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP

On retrouve le motif II, encore appelé motif Walker B, qui est constitué des acides aminés Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD) donnant son nom à cette famille d'hélicase. Les résidus aspartate et glutamate constituant ce motif interagissent avec l'ion magnésium complexé à l'ATP entraînant un changement de conformation du cœur hélicase. Ce mécanisme entraîne la formation d'un site enzymatique permettant l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au relargage de l'hélicase lorsque les deux brins d'ARN sont séparés (Cordin *et al.*, 2006; Linder and Jankowsky, 2011). D'autres motifs sont également impliqués dans l'interaction et l'hydrolyse de l'ATP, tels que les motifs I, II, Q, VI. Des mutations au niveau du motif I, encore appelé motif Walker A, réduisent la capacité de l'hélicase à interagir et hydrolyser l'ATP traduisant une perte de son activité ATPase et hélicase. Le motif Q semble être particulièrement important, il est connu pour se lier spécifiquement à l'adénine de l'ATP et jouer un rôle dans son hydrolyse, notamment chez la levure (Tanner *et al.*, 2003).

2.2 Les autres motifs

Les motifs permettant l'interaction entre les ARN hélicases à boîte DEAD et l'ARN impliquent les motifs Ia, Ib, Ic, IV, IVa et V. Ces motifs sont repartis sur les domaines 1 et 2 localisés au niveau du cœur hélicase. Les mécanismes contrôlés par les motifs III et Va n'ont pas été clairement définis.

Cependant, certaines études tendent à démontrer que ces deux motifs semblent être impliqués dans la communication entre les sites liant l'ATP et ceux liant l'ARN permettant ainsi leur coordination (Linder and Jankowsky, 2011).

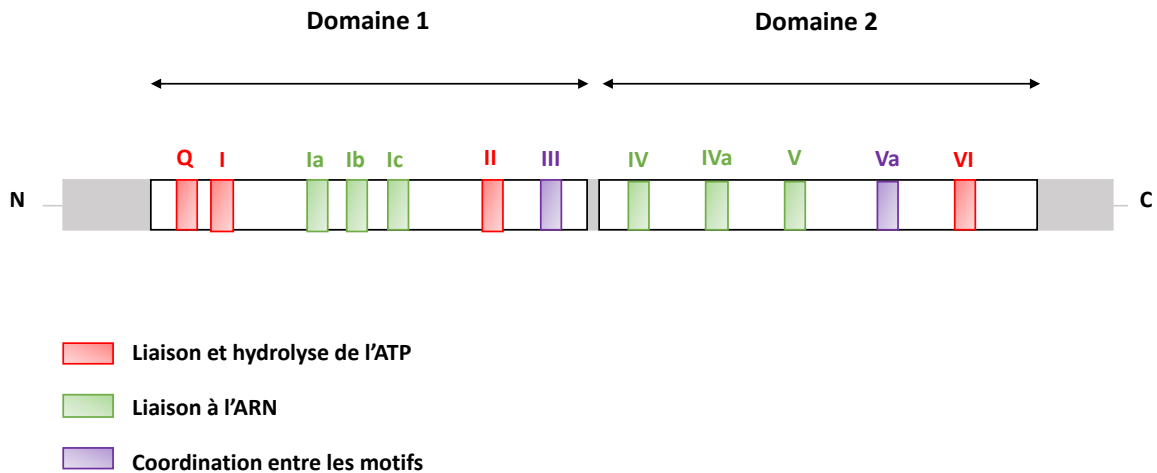


Figure 19 : Représentation schématique des différents motifs des hélicases à boîte DEAD. Les hélicases à boîte DEAD sont constituées d'un cœur hélicase composé de deux domaines où l'on retrouve divers motifs. La fonction biochimique des motifs est illustrée par les couleurs utilisées. *Modifié d'après* (Tuteja, Vashisht and Tuteja, 2008).

2.3 Les extrémités terminales

Contrairement au cœur hélicase, les extrémités N-terminales et C-terminales ne sont pas conservées et permettent aux hélicases de se lier à différentes protéines. Il est admis que ces interactions permettent aux hélicases d'être impliquées dans de multiples fonctions cellulaires indépendamment de leur activité d'hélicase. Parmi les hélicases illustrant cette variété de fonction, on retrouve les ARN hélicases à boîte DEAD DDX5 et DDX17.

II. Généralité sur DDX5 et son partenaire : l'ARN hélicase DDX17

1. Structure et localisation

DDX5 est identifiée pour la première fois en 1980 (Lane and Hoeffler, 1980). Elle est capable d'interagir avec DDX17, une autre ARN hélicase à boîte DEAD encore appelée p72. Les protéines DDX5 et DDX17 peuvent former des hétérodimères et présentent 90% d'homologie au niveau de leurs cœurs hélicase tandis que leurs

extrémités N-terminales et C-terminales possèdent respectivement 60 et 30% d'homologie (Fuller-Pace, 2013). Il est intéressant de noter que l'ARNm de DDX17 peut subir un épissage alternatif grâce à la présence d'un codon d'initiation de la traduction alternatif donnant naissance à une protéine plus grande de 79 acides aminés : p82. Des études effectuées *in vitro* ont démontré que ce variant d'épissage présente des propriétés identiques à p72 (Uhlmann-Schiffler, Rössler and Stahl, 2002) (Figure 20).

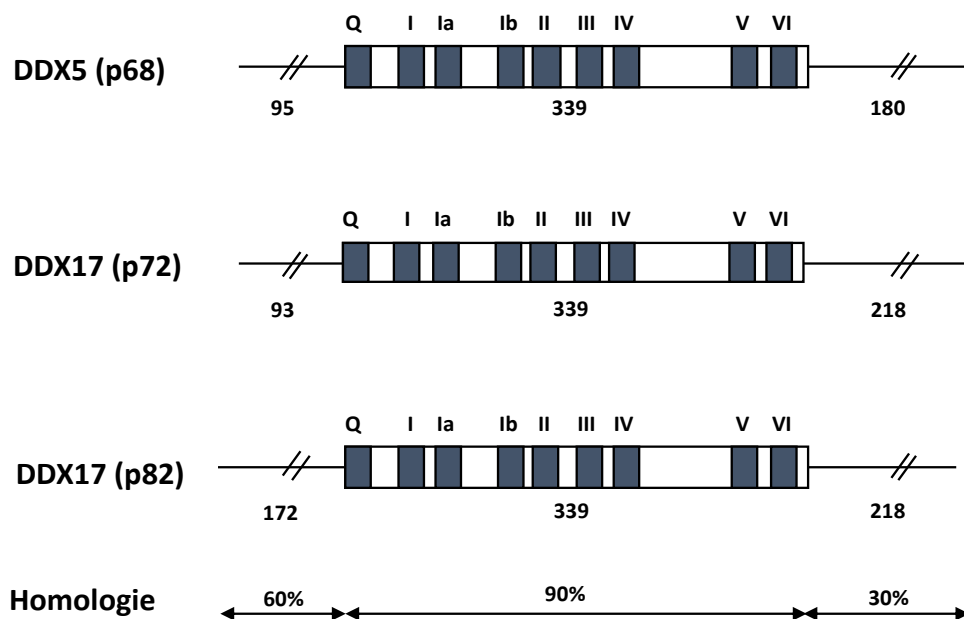


Figure 20 : Conservation des domaines constituant les ARN hélicases DDX5 et DDX17. Les hélicases DDX5 et DDX17 partagent une grande homologie de séquence au niveau de leur cœur hélicase constitué de 9 motifs conservés (Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V, VI) représentés en bleu foncé sur le schéma. Les régions N et C-terminales ne présentent pas le même degré d'homologie. Le variant d'épissage de DDX17 (p82) possède une extension de 79 acides aminés au niveau de la région N-terminale comparé à p72. Les nombres indiquent la quantité d'acides aminés présents dans les différentes régions des protéines. (Fuller-Pace and Moore, 2011).

DDX5 et DDX17 sont des protéines ubiquitaires. Elles sont présentes notamment au niveau des organes reproducteurs, du cœur, des muscles mais également du cerveau. Elles sont essentiellement localisées au niveau nucléaire mais peuvent également être présentes dans le cytoplasme (Kahlina *et al.*, 2004; Fuller-Pace and Moore, 2011). En effet, elles possèdent des séquences de localisation nucléaire (NLS) et d'export (NES) leur permettant de transiter entre le noyau et le cytoplasme (Wang *et al.*, 2009).

III. Fonctions moléculaires de DDX5 et DDX17

Les protéines DDX5 et DDX17 présentent une redondance au niveau leurs fonctions (Jalal, Uhlmann-Schiffler and Stahl, 2007) bien qu'elles possèdent également des rôles distincts (Fuller-Pace, 2013). Elles sont impliquées dans de nombreuses étapes de la régulation de l'expression génique, telles que la transcription, l'épissage alternatif, la dégradation des ARNm par le système NMD, l'export des ARNm, la biogénèse des ARNs ribosomiaux et des micro ARN. En effet, l'inhibition de l'expression de DDX5 altère la biogénèse de certains micro ARN (Wang, Huang and Hu, 2012) suggérant un rôle des hélicases dans ce mécanisme. D'ailleurs, une approche par spectrométrie de masse a révélé que DDX5 et DDX17 peuvent interagir avec le complexe DRISHA, un complexe protéique essentiel pour la biogénèse des micro ARN (Gregory *et al.*, 2004). La présence de séquences de localisation nucléaire et d'export suggère que DDX5 et DDX17 soient impliquées également dans les mécanismes d'export des ARNm. De plus, DDX5 interagit avec certains facteurs impliqués dans l'export des transcrits de façon ARN dépendante (Zonta *et al.*, 2013). D'autres études ont révélé, à partir d'une lignée cellulaire de mammifère, que l'inhibition de l'expression des hélicases par siRNA entraîne des dysfonctionnements dans la maturation des ARN ribosomiaux suggérant également leur implication dans ces mécanismes (Jalal, Uhlmann-Schiffler and Stahl, 2007).

L'implication de DDX5 et DDX17 dans la régulation de la transcription, l'épissage et la voie NMD est détaillée dans les parties suivantes.

1. Implication de DDX5 et DDX17 dans la régulation de la transcription

1.1 Mécanismes moléculaires

DDX5 et DDX17 semblent être des composants à part entière de la machinerie transcriptionnelle. Elles peuvent interagir avec l'ARN polymérase II, le co-activateur des récepteurs stéroïdiens (SRC1), l'ARN long non codant co-activateur des récepteurs stéroïdiens (SRA) ou encore les histones acétyl transférase (HAT) telles que pCAF, CBP et p300. D'autre part, les deux hélicases peuvent aussi interagir avec les histones déacétylases (HDAC) 1, 2 et 3 et ainsi réprimer la transcription (Wilson *et*

al., 2004; Jacobs *et al.*, 2007). Ce rôle de DDX5 et DDX17 dans la régulation de la transcription ne fait pas intervenir leur activité hélicase (Fuller-Pace, 2013).

De façon intéressante, l'implication de DDX5 dans la régulation de la transcription peut s'effectuer aussi via son interaction avec l'insulateur chromatinien CTCF (CCCTC binding factor). En effet, l'interaction de DDX5 avec CTCF module l'activité de ce dernier (Yao *et al.*, 2010). Par ailleurs, ce rôle co-activateur de DDX5 est largement dépendant de son interaction avec l'ARN long non codant SRA. La déplétion de SRA entraîne une diminution de 30% de l'interaction entre DDX5 et CTCF induisant une perte de la fonction insulatrice de ce dernier.

1.2 DDX5 et DDX17 des co-régulateurs des facteurs de transcription

DDX5 et DDX17 sont capables de réguler l'activité de divers facteurs de transcription. Elles agissent comme des co-activateurs ou co-répresseurs selon le contexte cellulaire.

Nous détaillerons ici de manière non exhaustive quelques facteurs de transcription dont l'activité est régulée par les hélicases DDX5 et/ou DDX17 (Tableau 2).

Des travaux ont mis en évidence que DDX5 et DDX17 sont des co-activateurs du récepteur aux œstrogènes (ERalpha) avec lequel elles interagissent (Fuller-Pace, 2013). Des travaux ont révélé que le rôle de DDX5 et DDX17 en tant que co-activateurs du récepteur aux œstrogènes semble être nuancé. La surexpression des hélicases DDX5 ou DDX17 en présence de systèmes rapporteurs active de façon similaire les récepteurs aux œstrogènes tandis que des expériences de siRNA dirigées contre les hélicases révèlent des différences d'activités. En effet, DDX17 semble avoir un effet plus important dans l'expression des gènes cibles de ERalpha comparativement à DDX5 (Fuller-Pace and Ali, 2008). Le rôle de DDX17 dans l'activation des récepteurs aux œstrogènes a été confirmé dans une autre étude (Wortham *et al.*, 2010). Des mécanismes similaires ont été observés pour le récepteur aux androgènes. Les deux hélicases sont recrutées au niveau du promoteur du gène PSA (*prostate specific antigen*), un gène cible du récepteur aux androgènes (Clark *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2009) Cependant, l'utilisation de systèmes rapporteurs contenant le gène de la

luciférase couplé au promoteur PSA a démontré que DDX5 est recrutée au niveau du promoteur où elle joue le rôle de co-activateur du récepteur aux androgènes en réponse à l'ajout d'androgènes synthétiques (Clark *et al.*, 2008) tandis que DDX17 n'a pas d'effet.

Bien que DDX5 et DDX17 soient toutes les deux capables d'interagir avec le suppresseur de tumeur p53, seule DDX5 joue le rôle de co-activateur de ce facteur de transcription (Bates *et al.*, 2005). En effet, l'inhibition de l'expression de DDX5 ou de DDX17 par siRNA montre que seule l'ARN hélicase DDX5 est importante pour induire l'activité transcriptionnelle de p53 en réponse à un dommage à l'ADN. D'ailleurs, DDX5 peut être recrutée au niveau du promoteur de p21 qui est un gène cible de p53 suite aux dommages à l'ADN (Bates *et al.*, 2005; Nicol *et al.*, 2013). DDX17 pourrait réguler l'activité de p53 en l'absence de tout stress cellulaire. En effet, DDX17 peut se lier à p300/CBP au niveau du promoteur du gène codant pour MDM2 (Shin and Janknecht, 2007). MDM2 est une ubiquitine ligase qui, en se fixant à p53 induit sa dégradation en condition basale. De plus, l'inhibition de l'expression de DDX17 par siRNA réduit de façon significative l'expression de MDM2 (Shin and Janknecht, 2007). Ces résultats ont été obtenus en l'absence de dommages à l'ADN connus pour activer p53 suggérant que DDX17 pourrait être impliquée dans l'activité basale de p53 tandis que DDX5 régule le facteur de transcription en condition de stress (Fuller-Pace and Moore, 2011).

Transcription	DDX5 et DDX17	DDX5	DDX17
Activation (nécessaire à la transcription des gènes cibles)	MyoD et NFAT5 Interagit avec CBP/p300, SRC-1, SRA Recrutement de pol II	AR, p53, Runx2, Notch1, E2F1, beta-catenine, nucleoplasmine Interagit avec Brg-1, TBP	MDM2, Er α
Inhibition	Interagit avec HDAC1,2,3 REST		
Insulation		Interagit avec CTCF de façon SRA dépendant et contrôle son activité	

Tableau 2 : Fonctions de DDX5 et DDX17 dans la régulation de la transcription. DDX5 et DDX17 sont des co-régulateurs de plusieurs facteurs de transcription. Il est mentionné dans le tableau uniquement les facteurs de transcription dont l'expression des gènes cibles est régulée par DDX5 et/ou DDX17. (*AR* : Androgen receptor, *CBP* : CREB binding site, *CTCF* : CCTC binding factor, *ER* : Estrogen receptor, *HDAC* : Histone deacetylase, *MDM2* : Mouse double minute 2 homolog, *NFAT5* : Nuclear factor of activated T cells, *PolII* : polymerase II, *REST* : RE1-silencing transcription factor, *Runx2* : Runt-related transcription factor 2, *SRA* : Steroid receptor RNA activator, *SRC* : Steroid receptor coactivator, *TBP* : TATA box binding protein). Modifié d'après (Fuller-Pace and Moore, 2011; Lambert et al., 2018).

2. Rôle de DDX5 et DDX17 dans la régulation de l'épissage

2.1 L'épissage, une étape majeure dans l'expression d'un gène

2.1.1 De l'expression à la maturation de l'ARN pré-messager

L'expression d'un gène regroupe une multitude d'étapes contrôlées à plusieurs niveaux. Elle commence par sa transcription au niveau nucléaire résultant de l'activité d'une machinerie de protéines complexes. La finalité de l'étape de transcription permet de former un ARN pré-messager (pré-ARNm) qui est une copie complète de la séquence d'ADN. Le transcrit primaire est ensuite modifié au cours de la « maturation ». Cette étape consiste en l'ajout d'une coiffe sur l'extrémité 5' et d'une polyadénylation de l'extrémité 3' permettant la protection du transcrit contre la dégradation.

2.1.2 L'épissage : un mécanisme complexe

Les exons forment les séquences codantes contenant l'information génétique. Ils sont séparés par des séquences généralement non codantes appelées les introns. Deux évènements essentiels se produisent au cours de l'épissage. Les introns sont coupés puis les exons sont liés bout à bout afin d'établir l'ARNm mature. Le transcrit mature est alors exporté dans le cytoplasme où il est traduit en protéine.

L'épissage des ARN pré-messagers concerne environ 95% des transcrits (Barash *et al.*, 2010). La réaction d'épissage se fait grâce à l'action du spliceosome. Ce dernier est un complexe dynamique de plusieurs ribonucléoprotéines, encore appelés snRNP, constitué d'ARNs et de plus de 200 protéines formant les particules U1, U2, U4/U6 et U5. Ces particules reconnaissent des séquences consensus situées aux extrémités des introns (Mount, 1982; Turunen *et al.*, 2013). Parmi ces sites d'épissage, on retrouve les sites 5' et 3', appelés respectivement « site donneur » et « site accepteur » localisés en amont et en aval de l'intron, un « point de branchement » situé en amont du site 3' ainsi qu'une séquence riche en pyrimidine localisée entre le point de branchement et le site 3'.

Au cours de la réaction d'épissage, la particule U1 interagit avec le site 5' tandis que la particule U2 s'associe au site de branchement formant ainsi le pré-spliceosome. Ensuite, les particules U4/U6 et U5 s'associent au complexe d'épissage entraînant le rapprochement physique des sites d'épissage. Le départ des particules U1 et U4 permet la formation d'un spliceosome actif qui par deux réactions successives de transestérification induit l'excision de l'intron et la ligation des deux exons (Jurica and Moore, 2002; Hoskins and Moore, 2012; Dvinge *et al.*, 2016) (Figure 21).

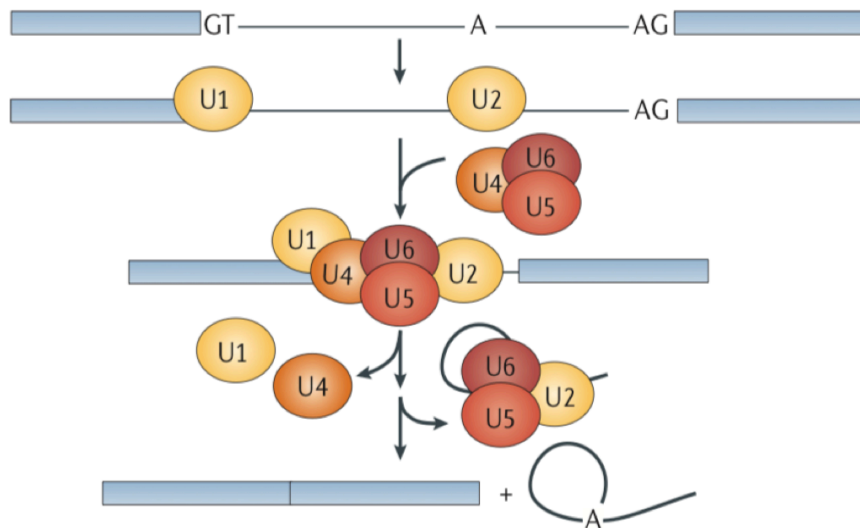


Figure 21 : Représentation simplifiée de l'exclusion d'un intron et de la ligation de deux exons adjacents lors de l'épissage. Les sites d'épissage 5' et 3' sont reconnus respectivement par U1 et U2 puis les autres particules sont recrutées au niveau du complexe d'épissage. Le départ de U1 et U4 induit la formation du spliceosome actif qui active l'excision de l'intron et la ligation des exons adjacents à la suite de deux réactions de transestérification. (Dvinge *et al.*, 2016).

L'inclusion des exons au sein du transcrit peut être alternative. L'épissage alternatif permet ainsi de produire plusieurs ARNm mature codant pour différentes isoformes à partir d'un seul pré-ARNm. Les exons alternatifs possèdent des sites d'épissage plus faibles que les exons constitutifs. Cette particularité réduirait la reconnaissance de ces exons par le spliceosome entraînant ainsi leur exclusion (Stamm *et al.*, 1994; Lee and Rio, 2015). D'autres facteurs jouent un rôle dans l'initiation de l'épissage, tels que les séquences « cis ». Ce sont des courtes séquences nucléotidiques qui ont la capacité de favoriser ou d'inhiber la reconnaissance d'un exon alternatif. L'initiation de l'épissage est également régulée par des facteurs dits « trans » qui ont la capacité de se lier aux séquences cis régulatrices. On compte deux familles principales de facteurs d'épissage, les protéines SR et les protéines hnRNP.

2.1.3 La régulation de l'épissage

Les facteurs SR sont des protéines riches en acides aminés sérine et arginine ayant la capacité d'interagir avec les séquences « cis » activatrices. Cette interaction entraîne la reconnaissance des sites d'épissage favorisant le recrutement du

spliceosome (Bourgeois *et al.*, 1999; Long and Caceres, 2009). Ainsi, les protéines SR sont connues pour promouvoir, le plus souvent, l'épissage bien que des études aient démontré que ces protéines sont également capables de l'inhiber. En effet, dans certains cas les protéines SR peuvent se lier à des séquences cis inhibitrices. De façon similaire, les protéines hnRNP peuvent aussi jouer un rôle positif dans l'épissage (Krecic and Swanson, 1999; Kelemen *et al.*, 2013).

Les protéines hnRNP (pour particules ribonucléoprotéiques hétérogènes nucléaires) ont la capacité d'interagir avec les séquences « cis » inhibitrices rendant les sites d'épissage inaccessibles. On peut citer comme exemple la protéine PTB (*Polypyrimidine Tract Binding Protein*) connue pour réguler négativement l'épissage de plusieurs transcrits. En effet, PTB inhibe l'interaction de la particule U2 avec l'ARN favorisant ainsi l'exclusion de l'exon alternatif (Sauliere *et al.*, 2006; Coutinho-Mansfield *et al.*, 2007; Llorian *et al.*, 2010; Kelemen *et al.*, 2013).

Certains facteurs d'épissage sont exprimés de façon tissu spécifique. C'est le cas notamment pour nPTB, NOVA 1 et NOVA 2 connus pour être exprimés spécifiquement au niveau du cerveau. La protéine PTB, encore appelée PTBP1, est exprimée essentiellement au niveau des cellules progénitrices neuronales puis son expression est largement diminuée dans les neurones différenciés où on retrouve de façon majoritaire le facteur d'épissage nPTB (ou PTBP2). Bien que PTBP1 et PTBP2 partagent une grande similarité au niveau de leurs structures et de leurs fonctions, ces derniers possèdent des gènes distincts situés respectivement sur le chromosome 19 et sur le chromosome 1 (Lilleväli, Kulla and Örd, 2001; Coutinho-Mansfield *et al.*, 2007).

2.1.4 Les Conséquences de l'épissage alternatif

L'épissage alternatif est une source importante de diversité du protéome. En effet, ce mécanisme permet de générer plusieurs protéines à partir d'un gène unique. Ainsi, un gène humain donne en moyenne deux ou trois transcrits matures. Il existe cependant des cas plus extrêmes comme le gène neurexine 3 pouvant donner plus de 1000 isoformes potentielles grâce à la réaction d'épissage alternatif.

L'épissage alternatif joue également un rôle quantitatif en régulant l'expression génique par l'activation de la voie du *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Au cours de la réaction d'épissage, l'inclusion ou l'exclusion de séquences introniques ou exoniques peut entraîner un décalage du cadre de lecture menant à la formation d'un codon de terminaison de la traduction prématuré. Le transcrite contenant le codon stop prématuré est alors reconnu et dégradé par le mécanisme du NMD aboutissant à une diminution de la production protéique (Figure 22).

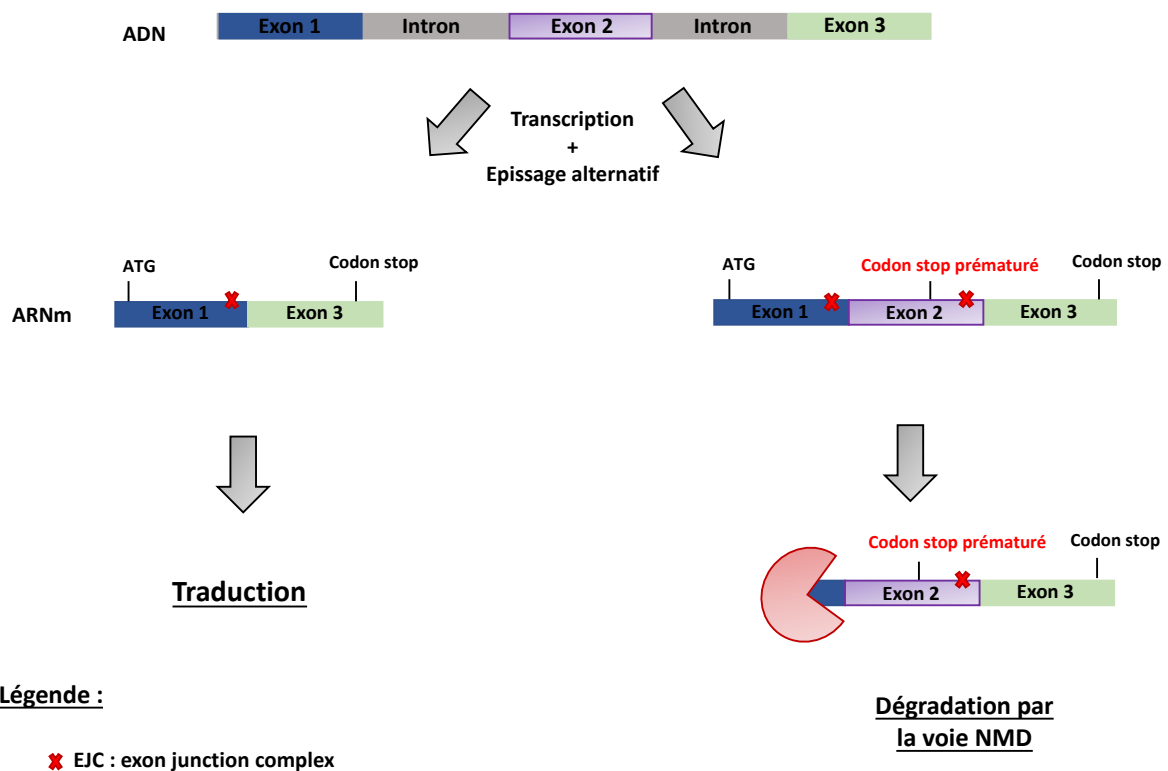


Figure 22 : Les conséquences de l'épissage alternatif. L'épissage alternatif permet de générer plusieurs protéines à partir d'un seul gène générant de ce fait une grande diversité du protéome . Ce mécanisme peut également réguler l'expression génique par l'activation de la voie NMD (*nonsense mediated mRNA decay*). En effet, l'inclusion ou l'exclusion d'un exon au cours de l'épissage alternatif peut entraîner la formation de codon stop prématuré reconnu par la voie NMD aboutissant à la dégradation du transcrite.

La voie NMD est détaillée dans la partie suivante (voir 3.1. Le mécanisme du NMD) où les mécanismes activant et modulant ce processus y sont décrits.

2.2 DDX5 et DDX17 : Des facteurs clés dans la régulation de l'épissage

En 1998, pour la première fois, une protéine appartenant à la famille des ARN hélicases à boîte DEAD : DDX5 a été identifiée dans l'interactome du spliceosome par spectrométrie de masse à partir d'un lysat nucléaire de cellules HeLa (Neubauer *et al.*, 1998). Quelques années plus tard, DDX17 a été co-purifiée avec la particule U1snRNP suggérant que DDX17 pourrait, à travers son activité d'hélicase, assister U1 à réorganiser et à interagir avec le site d'épissage 5' (Lee, 2002) à l'image de DDX5 déjà connue pour se lier au site d'épissage 5' de la particule U1 (Liu, 2002). Par ailleurs, la déplétion de DDX5 par siRNA dans la lignée cellulaire HT-29 induit une accumulation d'ARN non épissés (Lin *et al.*, 2005). La génération de mutants a permis de montrer que l'activité hélicase de DDX5 joue un rôle majeur dans la régulation de l'épissage. En effet, la mutation des motifs V et VI, inactivant son activité hélicase et ATPase, inhibe la dissociation de la snRNP U1 du site 5' empêchant la formation d'un spliceosome actif (Lin *et al.*, 2005).

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication de DDX5 dans la régulation de l'épissage alternatif. D'ailleurs, une régulation coordonnée de l'épissage alternatif de plusieurs transcrits a été déterminée entre DDX5 et le facteur d'épissage hnRNPA1. En effet, des analyses par RNA-seq après l'inhibition de l'expression de DDX5 et de hnRNPA1 ont démontré que les deux protéines régulent en commun l'épissage alternatif d'une centaine de transcrits (Lee, Wang and Rio, 2018). Parmi les transcrits ciblés par DDX5, on retrouve notamment le proto-oncogène H-Ras, une protéine régulatrice de la voie de signalisation mitogène. DDX5 est impliquée dans le remodelage d'une structure secondaire tige-boucle du transcrit H-Ras, située en aval de l'exon IDX, inhibant ainsi la fixation du facteur d'épissage hnRNP H (Guil *et al.*, 2003; Camats *et al.*, 2008). Une autre étude a démontré que DDX5 facilite l'interaction du facteur d'épissage MBNL1 au niveau de séquences régulatrices du transcrit codant pour la troponine T cardiaque (TNNT2) modulant ainsi son épissage alternatif (Laurent *et al.*, 2012). L'épissage de l'exon 10 du transcrit Tau est régulé par DDX5. Cette dernière induit le remodelage d'une structure tige-boucle localisée en aval du site 5'. Ce mécanisme permet la reconnaissance du site par le spliceosome et ainsi l'inclusion de l'exon (Kar *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de DDX5 dans la régulation de l'épissage alternatif de transcrits neuronaux. D'ailleurs, il a été

récemment démontré que DDX5 régule également l'épissage alternatif du transcrit MBP (*myelin basic protein*), une protéine exprimée dans les oligodendrocytes et impliquées dans la formation des gaines de myéline (Hoch-Kraft *et al.*, 2018).

Concernant DDX17, l'utilisation d'un minigène codant pour CD44 a permis de mettre en évidence que cette dernière favorise l'inclusion de l'exon 4 en déstabilisant une structure tige-boucle connue pour masquer le site d'épissage 5' situé en aval de cet exon (Honig *et al.*, 2002). Ainsi, DDX5 et DDX17 sont toutes deux impliquées dans l'épissage alternatif de plusieurs transcrits bien que leur mode de fonctionnement dans ce mécanisme semble présenter quelques différences (Fuller-Pace and Moore, 2011; Dardenne *et al.*, 2014; Samaan *et al.*, 2014).

3. DDX5 un nouveau régulateur du NMD

Le NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) est un mécanisme de dégradation des ARNm portant un codon stop prématuré (PTC) empêchant ainsi la synthèse de protéines tronquées pouvant être non fonctionnelles et néfastes pour les cellules. Le NMD est également un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de 5 à 10% d'ARNm physiologiques. C'est un mécanisme très conservé qui est retrouvé dans de nombreux organismes eucaryotes (Behm-Ansmant *et al.*, 2007) incluant la levure (*S. cerevisiae*), les vers (*C. elegans*), les drosophiles et les mammifères.

3.1 Le mécanisme du NMD

Plusieurs protéines forment le cœur de la machinerie du système NMD, telles que les protéines appelées Upf (*upframeshift*) et les protéines SMG (*suppresor with morphological effect on genitalia*).

3.1.1 Les protéines régulatrices du NMD

3.1.1.1 Les protéines Upf

Il existe trois protéines Upf (Upf1-3), on retrouve Upf1 et Upf2 situées essentiellement au niveau du cytoplasme et Upf3 qui transite entre le noyau et le cytoplasme.

Ces protéines interagissent entre elles ainsi qu'avec les ribosomes et d'autres protéines régulatrices du mécanisme NMD.

Upf1 est une protéine essentielle de la voie NMD qui appartient à la famille des ARN hélicases. L'activité hélicase de Upf1 est primordiale pour la régulation du NMD. En effet, dans deux lignées cellulaires de mammifères, il a été démontré que la substitution de l'arginine en cystéine au niveau du résidu 844 situé dans le domaine hélicase de Upf1 entraîne une abolition de son activité hélicase et une inhibition de la dégradation des ARNm par le système NMD (Sun *et al.*, 1998). Upf1 peut interagir avec diverses protéines par l'intermédiaire de ses régions N-terminale et C-terminale. Ces régions contiennent plusieurs résidus sérine pouvant être phosphorylés par la kinase SMG1. D'ailleurs, la phosphorylation de Upf1 par cette kinase est essentielle car elle permet à l'hélicase de recruter des facteurs clés nécessaires pour l'activation de la voie NMD (Yamashita *et al.*, 2001).

Upf2 peut interagir avec Upf1 et Upf3 par l'intermédiaire de son domaine N-terminal et C-terminal respectivement. Ainsi, Upf2 permet de former un « pont » entre les protéines Upf1 et Upf3 (Serin *et al.*, 2001). Une approche par immunofluorescence a montré que Upf2 est essentiellement présente au niveau du cytoplasme bien qu'elle possède également des séquences de localisation nucléaire situées dans sa partie C-terminale suggérant qu'elle puisse transiter au niveau de ce compartiment (Serin *et al.*, 2001). D'ailleurs, des travaux ont mis en évidence que Upf2 peut être retrouvée aussi bien au niveau du cytoplasme que du noyau (Lejeune *et al.*, 2002).

Concernant la protéine Upf3, cette dernière est connue pour avoir deux gènes chez les mammifères : Upf3 (encore appelée Upf3A) localisé sur le chromosome 13 et Upf3X situé sur le chromosome X (encore appelée Upf3B). Ces deux protéines possèdent un domaine RRM (*RNA recognition motif*), situé au niveau de la région N-terminale, leur permettant d'interagir avec la protéine Upf2 (Kadlec, Izaurralde and Cusack, 2004). Le niveau d'implication de Upf3A et Upf3B dans la régulation de la voie NMD semble être différent entre les deux protéines. En effet, l'inhibition de l'expression par siRNA de Upf3B abolit le NMD, tandis que l'inhibition de l'expression de Upf3A n'a pas d'effet. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait qu'il existe une différence de séquences nucléotidiques entre les deux protéines au niveau de leurs domaines C-

terminaux. Cette différence modulerait ainsi leur capacité à interagir avec des protéines régulatrices de la voie NMD (Kunz *et al.*, 2006).

3.1.1.2 Les protéines SMG

L'activation du NMD implique également la présence de protéines SMG : SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8 et SMG9 (*suppressor with morphological effect on genitalia*). Ces protéines régulent les différentes étapes de phosphorylation et de déphosphorylation de Upf1.

SMG1 appartient à la famille des PI3KK (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinases*) et permet la phosphorylation de Upf1, une étape majeure dans l'activation du NMD. En effet, la voie NMD est inhibée lorsque l'activité kinase de SMG1 est abolie (Yamashita *et al.*, 2001). Les protéines SMG8 et SMG9 interagissent avec SMG1 afin de réguler l'activité kinase de cette dernière (Yamashita *et al.*, 2009). Le complexe formé par ces trois protéines est appelé SMG1-C (Melero *et al.*, 2014). SMG8 permet de recruter SMG1 au niveau des protéines régulatrices du NMD tandis que SMG9 régule l'interaction entre SMG8 et SMG1 (Yamashita *et al.*, 2009).

Les protéines SMG5, SMG6 et SMG7 sont impliquées dans l'étape de déphosphorylation de Upf1. Les trois protéines interagissent avec Upf1 ainsi qu'avec la sous-unité catalytique de la phosphatase PP2A. Il est admis que SMG5, SMG6 et SMG7 favorisent l'interaction entre Upf1 et PP2A jouant ainsi le rôle d'adaptateur entre les deux protéines et participant de façon indirecte à la déphosphorylation de Upf1 (Chiu *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2003). La surexpression d'un mutant SMG5, inhibant sa capacité à interagir avec Upf1, empêche la déphosphorylation de Upf1. Les résultats de l'étude révèlent également que la surexpression de ce mutant SMG5 altère significativement la dégradation des ARNm par la voie NMD suggérant que l'étape de déphosphorylation de Upf1 est primordiale pour l'activation du NMD (Ohnishi *et al.*, 2003).

3.1.2 Les mécanismes d'activation du NMD

La capacité à distinguer un codon stop normal d'un codon stop prématuré ou PTC (*premature termination codon*) est un aspect crucial du NMD. Les protéines impliquées dans l'activation du NMD sont très conservées, cependant les mécanismes de reconnaissance d'un codon stop prématuré varie à travers les espèces. A la fin du vingtième siècle, il a été admis chez les mammifères que la distinction entre un codon stop normal et un codon stop prématuré dépend de la position du codon de terminaison au niveau du transcrit (Nagy and Maquat, 1998). Il est alors créé « la règle des 50 à 55 nucléotides » stipulant que seul un codon stop situé au minimum entre 50 et 55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon est reconnu par la voie NMD entraînant la dégradation du transcrit. Ainsi, les codons stop physiologiques se trouvant généralement au niveau du dernier exon ne sont pas reconnus pas le système NMD (Cheng, Fogel-Petrovic and Maquat, 1990; Zhang, Sun, Qian and Maquat, 1998; Zhang, Sun, Qian, LaDuca, *et al.*, 1998) (Figure 23).

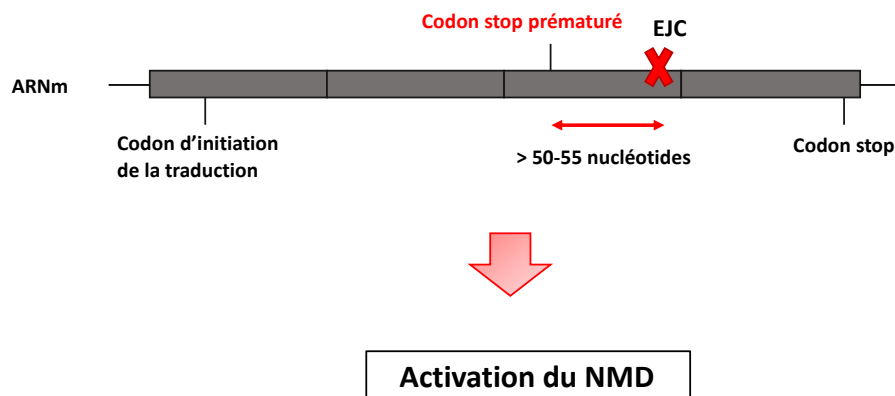


Figure 23 : La règle des 50 à 55 nucléotides. La présence d'un codon stop en amont d'un complexe de jonction exonique (EJC) active la voie NMD lorsque le PTC est situé à une distance égale ou supérieure à 50-55 nucléotides de l'EJC.

L'épissage est également une étape majeure dans l'activation de la voie NMD. Une étude menée sur l'ARNm du gène codant pour la triosephosphate isomerase (TPI) a mis en évidence que la reconnaissance du PTC a lieu uniquement après l'épissage du transcrit (Zhang and Maquat, 1996). Ces résultats suggèrent qu'il se produit un évènement au cours de l'épissage jouant un rôle dans la reconnaissance des codons stop prématurés par le NMD. Il a été supposé que l'évènement en question serait la

mise en place de marques protéiques déposées par le splicéosome au cours de l'épissage.

Lors de l'épissage, des complexes protéiques appelés EJC (*exon junction complex*) sont déposés entre 20 et 24 nucléotides en amont des jonctions exon-exon du transcrit (Le Hir *et al.*, 2001). De façon intéressante, plusieurs protéines régulatrices du NMD, telles que Upf2, Upf3B et Upf3A, interagissent transitoirement avec des protéines de l'EJC confirmant un possible rôle de ce complexe dans la reconnaissance et la dégradation des ARNm contenant des PTC (Kim, Kataoka and Dreyfuss, 2001; Lejeune *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2003). Le rôle majeur de l'EJC dans l'activation du NMD a été confirmé par plusieurs études. En effet, l'inhibition par siRNA de l'expression de protéines constituant « le cœur » de l'EJC abolit le NMD (Gehring *et al.*, 2003; Ferraiuolo *et al.*, 2004) tandis que la fixation de ces protéines en aval d'un codon stop active la voie NMD (Gehring *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats valide donc l'importance de l'EJC dans l'activation de la voie NMD. Récemment, une analyse transcriptomique étudiant la position relative des EJCs a révélé que ces derniers ne sont finalement pas forcément positionnés au niveau de chaque jonction exon-exon (Saulière *et al.*, 2012). Il s'avère qu'environ la moitié des EJCs sont présents à une position non canonique (Hir, Saulière and Wang, 2016). A l'avenir, il serait intéressant de déterminer si ces variations dans le positionnement des EJCs au niveau des ARNm peuvent avoir un impact dans l'efficacité d'activation du NMD.

3.1.3 Les différentes étapes du NMD

3.1.3.1 Un mécanisme co-translationnel

Plusieurs études ont démontré un lien étroit entre activation du NMD et traduction. Une abolition du NMD est observée après l'inhibition de la traduction à l'aide de différentes drogues, telles que la cycloheximide ou la puromycine. Ces résultats soulignent que la reconnaissance et la dégradation des transcrits par la voie NMD nécessite la traduction (Carter *et al.*, 1995; Dang *et al.*, 2009). Par ailleurs, plusieurs travaux ont mis en évidence que la reconnaissance des codons stop prématurés a lieu au cours du premier tour de traduction (Ishigaki *et al.*, 2001; Lejeune *et al.*, 2002). Ces résultats

peuvent s'expliquer par le fait que le codon stop prématuré doit être reconnu précocement afin d'éviter à la cellule la synthèse d'une protéine tronquée et non fonctionnelle. Ce modèle est renforcé par l'implication de CBP80 dans l'activation de la voie NMD. Cette protéine forme des hétérodimères avec CBP20 et interagit avec l'extrémité 5' des transcrits lors du premier tour de traduction.

Le rôle de CBP80 dans la régulation du NMD a été démontré par différentes études. Elle est capable d'interagir avec Upf1 et de favoriser l'interaction entre Upf1 et Upf2 augmentant, de ce fait, l'efficacité de la voie NMD (Hosoda *et al.*, 2005). Une autre étude a mis en évidence que CBP80 régule la voie NMD au niveau de deux étapes différentes. D'une part, elle favorise la formation du complexe SURF en permettant l'interaction entre Upf1-SMG1 et les facteurs de terminaison de la traduction eRF1-eRF3. D'autre part, CBP80 permet également l'interaction entre Upf1-SMG1 et Upf2, entraînant la phosphorylation de Upf1 et l'activation de la voie NMD (Hwang *et al.*, 2010; Ivanov and Anderson, 2010).

Ainsi, il a été admis qu'au cours du premier tour de traduction, le ribosome élimine les EJs de l'ARNm. Lorsque le ribosome est face à un codon stop prématuré, l'activité de ce dernier est alors stoppée malgré la présence d'autres EJs en aval. La présence de ces EJs non éliminés révèle à la machinerie de traduction que le codon stop est en fait un codon stop prématuré et par conséquent l'ARNm ne sera pas traduit mais dégradé par la voie NMD (Figure 24).

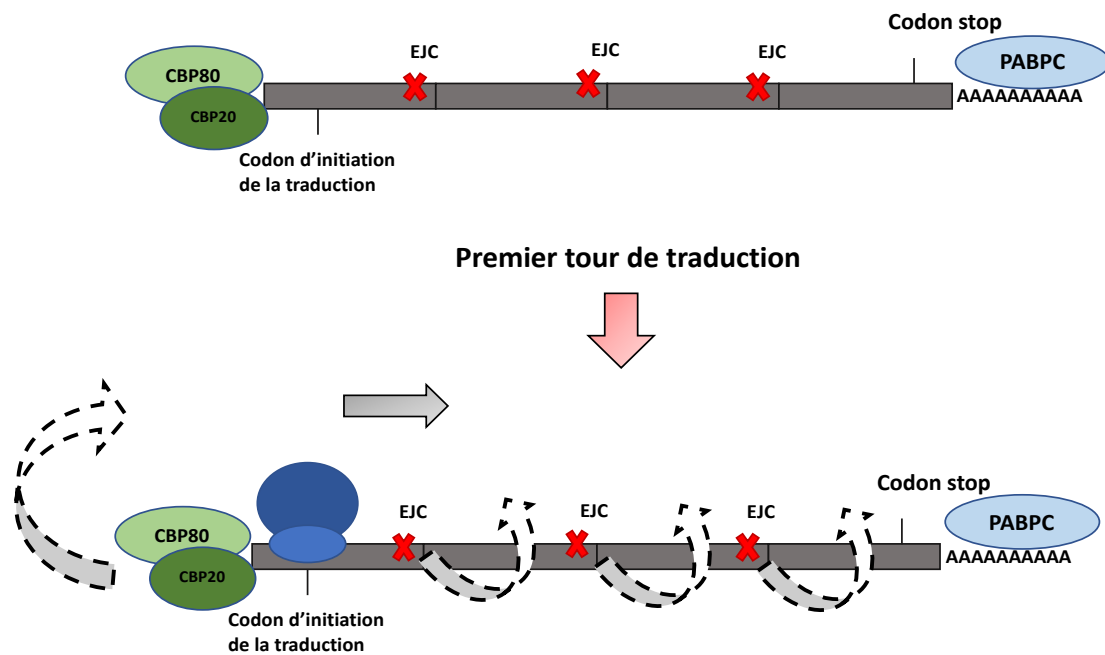


Figure 24 : Représentation schématique du premier tour de traduction. Au cours du premier tour de traduction, les ribosomes éliminent les complexes protéiques situés en amont des jonctions exoniques : les EJC. Le complexe CBP80-CBP20 est également remplacé par la protéine eIF4E.

Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus quelques années plus tard. En effet, il a été mis en évidence que certains ARNm interagissant avec eIF4E pouvaient être dégradés par la voie NMD (Durand and Lykke-Andersen, 2013; Rufener and Mühlemann, 2013). La protéine eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*) est recrutée au niveau de l'extrémité 5' des transcrits après le premier tour de traduction. Ces nouvelles données ont conduit à un nouveau modèle de la voie NMD où les transcrits peuvent être dégradés à tous moments de la traduction et pas uniquement au cours du premier tour (He and Jacobson, 2015; Karousis and Mühlemann, 2018).

3.1.3.2 La formation du complexe DECID

Lorsque le codon stop prématuré est reconnu, les multiples protéines citées précédemment vont alors s'associer formant différents complexes activant la voie NMD.

La protéine UPF1 est recrutée au niveau du codon stop prématuré après sa reconnaissance par le ribosome. Il a été mis en évidence que Upf1 s'associe alors avec le complexe SMG1-C, constitué de la kinase SMG1, SMG8 et SMG9, ainsi qu'avec eRF1 et eRF3 (*eukaryotic release factor*), des facteurs de terminaison de la traduction (Czaplinski *et al.*, 1998). Cette interaction permet de former le complexe SURF (Kashima *et al.*, 2006). Ce complexe interagit ensuite les protéines Upf2 et Upf3B localisées au niveau de l'EJC. L'inhibition de l'expression de Upf2 par la transfection de siRNA entraîne une abolition de l'interaction entre le complexe SURF et l'EJC (Kashima *et al.*, 2006). Ainsi, il a été admis que la liaison entre les deux complexes se fait par l'intermédiaire de Upf2. Plus tard, des travaux ont démontré que l'abolition de l'interaction entre Upf1 et Upf2 n'altère pas l'activation du NMD suggérant que la liaison entre les complexes SURF et EJC a toujours lieu dans ces conditions. Ces résultats permettent de supposer que l'interaction entre ces deux complexes pourrait se faire également par l'intermédiaire de Upf3B (Ivanov *et al.*, 2008) (Figure 25).

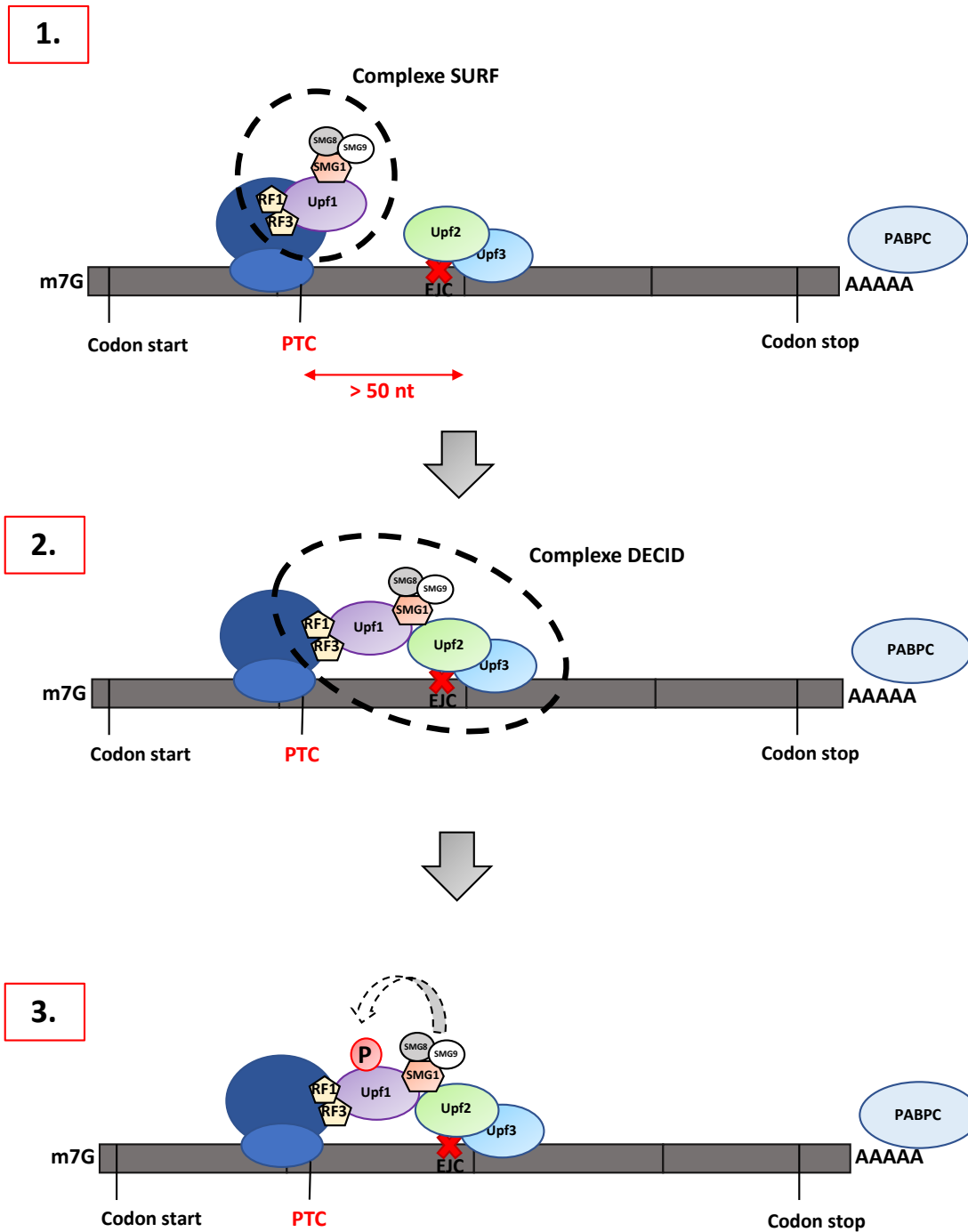


Figure 25 : Représentation schématique des différentes étapes activant la voie NMD. Lorsque le ribosome rencontre un codon stop prématuré (PTC) situé à 50 nucléotide d'un EJC, le complexe SURF est alors assemblé au niveau du PTC constitué des protéines suivantes : RF1, RF2, Upf1, et des protéines SMG (1-8-9) (**Étape 1**). Le complexe SURF va ensuite interagir avec l'EJC comportant les protéines Upf2 et Upf3. Cette étape permet de générer le complexe DECID (**Étape 2**). La formation du complexe DECID permet de phosphoryler l'hélicase Upf1 (**Étape 3**) entraînant le recrutement des enzymes de la dégradation (voir figure 26). (M7G représente la coiffe 5', AAAAA représente la queue polyadénylée et PABPC : cytoplasmic poly(A) binding protein). Modifié d'après (Hug, Longman and Cáceres, 2015).

L'association de SURF et de l'EJC forme le complexe DECID (*Decay inducing complex*) entraînant la phosphorylation de Upf1 et la dissociation de eRF1 et eRF3 (Kashima *et al.*, 2006; Hug, Longman and Cáceres, 2015). La phosphorylation de Upf1 est une étape majeure dans l'activation du NMD car elle permet d'inhiber la traduction et de recruter les protéines SMG5-SMG7 ou SMG6 et d'autres facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm (Isken *et al.*, 2008; Okada-Katsuhata *et al.*, 2012). Comme expliqué précédemment, les facteurs SMG5, SMG6 et SMG7 induisent la déphosphorylation de Upf1 par le recrutement de PP2A au niveau du complexe (Ohnishi *et al.*, 2003; Kashima *et al.*, 2006). SMG6 est une endonucléase clivant l'ARNm au niveau du codon stop prématuré et initiant la dégradation du transcrit (Huntzinger *et al.*, 2008; Eberle *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2015) tandis que SMG5 et SMG7 forment un hétérodimère activant la dégradation de l'ARNm cible par la voie exonucléolytique (Loh, Jonas and Izaurralde, 2013). La sous-unité SMG7 recrute la machinerie de dégradation des ARNm. En effet, il a été mis en évidence que le domaine N-terminal de SMG7 permet son interaction avec les protéines SMG5 et Upf1 tandis que son domaine C-terminal favorise sa liaison avec les facteurs de dégradation (Unterholzner and Izaurralde, 2004).

Les enzymes intervenant dans la dégradation des ARNm contenant un codon stop prématuré sont les mêmes que celles impliquées chez les ARNm normaux (Schoenberg and Maquat, 2012). Tout d'abord, la dégradation du transcrit ciblé par le NMD subit une étape de déadénylation et/ou de decapping par l'action de différentes enzymes impliquées dans ces mécanismes (Yamashita *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que la dégradation de l'ARNm cible peut se faire dans le sens 5'→3' ou dans le sens 3'→5'. En effet, des travaux ont révélé que les 3 protéines Upf peuvent interagir avec les exonucléases 5'→3', telles que XRN1 et XRN2, ainsi qu'avec les exonucléases 3'→5' : RRP4 et PARN (Lejeune, Li and Maquat, 2003; Unterholzner and Izaurralde, 2004) (Figure 26).

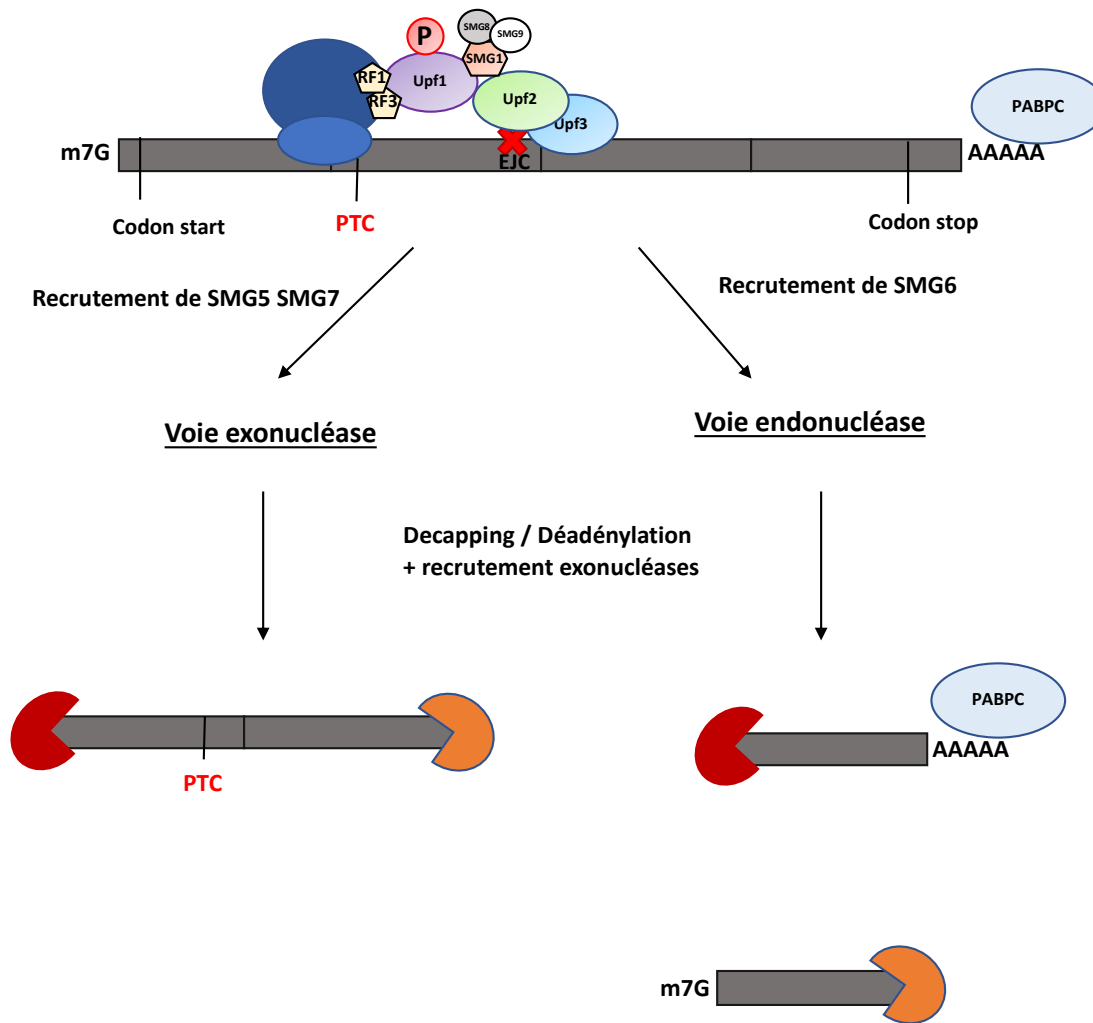


Figure 26 : Représentation schématique de la dégradation des ARNm par la voie NMD. Le recrutement de l'hétérodimère SMG5-SMG7 au niveau de l'hélicase UPF1 phosphorylée active la dégradation du transcrit par la voie des exonucléases. Dans ce cas, les enzymes de decapping et de déadénylation sont recrutées dans un premier temps puis les exonucléases digèrent les extrémités libres du transcrit. La protéine SMG6 peut aussi être recrutée au niveau de Upf1 phosphorylée. Dans ce cas, SMG6 clive directement le transcrit au niveau du PTC puis les deux fragments sont dégradés par des exonucléases. *Modifié d'après* (Hug, Longman and Cáceres, 2015).

3.1.4 Rôle physiologique du NMD

3.1.4.1 *Comment se forme un codon stop prématuré ?*

La formation d'un codon stop prématuré peut survenir après différents phénomènes. Il peut se former après des modifications au niveau de l'ADN. En effet, la présence d'un codon stop prématuré peut provenir de mutations non-sens, connues pour substituer un nucléotide par un autre générant un codon de terminaison de la traduction. D'autres mutations telles que des délétions ou des insertions de nucléotides peuvent être également à l'origine de PTC en provoquant un décalage du cadre de lecture. Ces décalages du cadre de lecture peuvent aussi prendre naissance suite à des mutations géniques perturbant l'épissage. Les PTC peuvent également apparaître après des événements se déroulant au niveau de l'ARN. Par exemple, des erreurs lors de l'épissage alternatif des ARN peuvent être à l'origine des PTC. D'autres études ont révélé que des erreurs de l'ARN polymérase II au cours de la transcription peuvent également faire apparaître des PTC, bien que le taux d'erreur de l'ARN polymérase étant très bas, l'épissage alternatif resterait la source majeure des codons stop prématurés (Lejeune and Maquat, 2005).

3.1.4.2 *Les substrats physiologiques*

Le NMD permet également de réguler l'expression de certains ARNm physiologiques de façon post-transcriptionnelle (Figure 27). Cette régulation a un impact sur de nombreux mécanismes physiologiques tels que la différenciation cellulaire, la réponse au stress ou dans le développement de pathologies (Nickless, Bailis and You, 2017). Des analyses par microarrays, après inhibition de l'expression de Upf1 par siRNA, ont mis en évidence qu'environ 5% des transcrits sont surexprimés suite à l'inhibition du NMD dans les cellules HeLa (Mendell *et al.*, 2004). Une autre équipe a estimé que 1,5% des transcrits seraient surexprimés après inhibition de l'expression de Upf2 par ARNi (Wittmann, Hol and Jäck, 2006). Ces deux études révèlent également qu'une quantité équivalente de transcrits est sous-exprimée dans ces conditions. Pour expliquer ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une partie des gènes surexprimés suite à l'inhibition du NMD seraient impliqués dans des mécanismes de répression de la transcription. Ainsi, entre 4 et 10% des transcrits seraient régulés

directement ou indirectement par la voie NMD (Mendell *et al.*, 2004; Wittmann, Hol and Jäck, 2006). Des travaux menés chez la levure et la drosophile confirment la régulation de transcrits physiologiques par la voie NMD (He *et al.*, 2003; Silva and Romão, 2009).

Les ARNm physiologiques pouvant être dégradés par la voie NMD présentent certaines caractéristiques, parmi lesquelles on retrouve :

La présence d'un intron localisé dans la partie 3'UTR d'un ARNm peut le rendre accessible à la machinerie de la voie NMD, son codon de terminaison de la traduction physiologique se trouvant alors en amont d'une jonction exon-exon (Nickless, Bailis and You, 2017).

Il existe également un lien entre la longueur des séquences 3'UTR et la reconnaissance des transcrits par la voie NMD. En effet, différentes approches de purifications ont mis en évidence que Upf1 interagit préférentiellement avec les ARNm présentant une séquence 3'UTR longue (Hogg and Goff, 2010; Hurt, Robertson and Burge, 2013). Ces travaux révèlent aussi que cette interaction est suffisante pour activer la dégradation du transcrit par la voie NMD. Afin d'expliquer ces résultats, les auteurs ont admis que la grande taille de certaines séquences 3'UTR (supérieure à 1000 nucléotides) empêcherait l'interaction entre les facteurs de terminaison de la traduction eRF1/ eRF3 et PABPC1 localisés respectivement au niveau du codon stop et de la queue poly-A du transcrit nouvellement synthétisé. Cet événement permettrait à Upf1 de se lier au niveau au transcrit où elle recruterait les facteurs du NMD. D'ailleurs, des études ont mis en évidence l'existence d'une compétition d'interaction entre Upf1 et PABPC1 avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (Ivanov *et al.*, 2008; Singh, Rebbapragada and Lykke-Andersen, 2008). L'interaction entre eRF1/eRF3 et PABPC1 est connue pour préserver la stabilité du transcrit tandis que la liaison entre Upf1 et les facteurs de terminaison de la traduction active la voie NMD (Kashima *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que la longueur de la séquence 3'UTR ne semble pas être la seule caractéristique permettant la reconnaissance du transcrit par Upf1 puisque des travaux ont mis en lumière que certaines séquences 3'UTR courtes (inférieure à 1000 nucléotides) pouvaient également activer le NMD via leur interaction avec Upf1 (Hurt, Robertson and Burge, 2013). Récemment, des

travaux ont mis en évidence que les séquences 3'UTR riches en nucléotides GC sont reconnues de façon plus favorable par la voie NMD comparé aux transcrits non dégradés. Ces résultats renforcent donc l'idée que la taille des séquences 3'UTR ne serait pas le seul facteur impliqué dans la reconnaissance des transcrits physiologiques par la voie NMD (Colombo *et al.*, 2017).

Certaines séquences nucléotidiques peuvent induire un décalage du cadre de lecture au moment de la traduction de l'ARNm par le ribosome générant un codon stop prématuré pouvant être reconnu par le NMD. Ce phénomène, encore appelé PRF (*programmed ribosomal frameshifting*) est surtout observé chez les virus et les bactéries bien qu'il puisse se produire également dans certains gènes chez les cellules eucaryotes. (Belew, Advani and Dinman, 2011; Belew *et al.*, 2014).

Une autre caractéristique observée dans les substrats physiologiques de la voie NMD est la présence d'un uORF (*upstream open reading frame*) au niveau du transcrit, soit d'un cadre ouvert de lecture situé en amont du cadre de lecture principal. Le codon stop de l'uORF peut alors être reconnu comme un codon stop prématuré et ainsi activer le NMD (Barbosa, Peixeiro and Romão, 2013; Hurt, Robertson and Burge, 2013). Cependant tous les transcrits contenant un uORF ne sont pas soumis au NMD. En effet, la longueur de l'uORF et le temps mis par le ribosome pour traduire la séquence sont des facteurs pouvant influencer la reconnaissance du transcrit par la voie NMD. Chez les plantes, il a été déterminé qu'un uORF inférieur à 35 codons échappe à la voie NMD tandis qu'un uORF plus long y est soumis (Nyikó *et al.*, 2009). Cette résistance au NMD proviendrait de la capacité des transcrits, contenant un petit uORF, à adopter une forme circulaire au cours de la traduction. Cette conformation favorise le rapprochement entre le codon de terminaison de l'uORF et les protéines PABPC1 empêchant de ce fait le recrutement des protéines régulatrices du NMD (Silva *et al.*, 2008).

Des travaux ont mis en évidence la dégradation de l'ARNm codant pour la protéine GPx1 (glutathion peroxydase 1) par le système NMD en absence de sélénium. GPx1 est une sélénoprotéine dont le transcrit contient des codons UGA codant pour la sélélocystéine en présence d'une forte quantité de sélénium dans les cellules. Cependant, en condition de privation de sélénium le codon est alors reconnu comme

un codon stop prématuré activant de ce fait le NMD (Moriarty, Reddy and Maquat, 1998).

Des événements au niveau de l'épissage alternatif de certains ARNm peuvent également induire la formation de PTC. Ce phénomène a notamment été observé chez certains facteurs d'épissage permettant ainsi de réguler leur expression. Cette dernière caractéristique est détaillée dans la partie suivante.

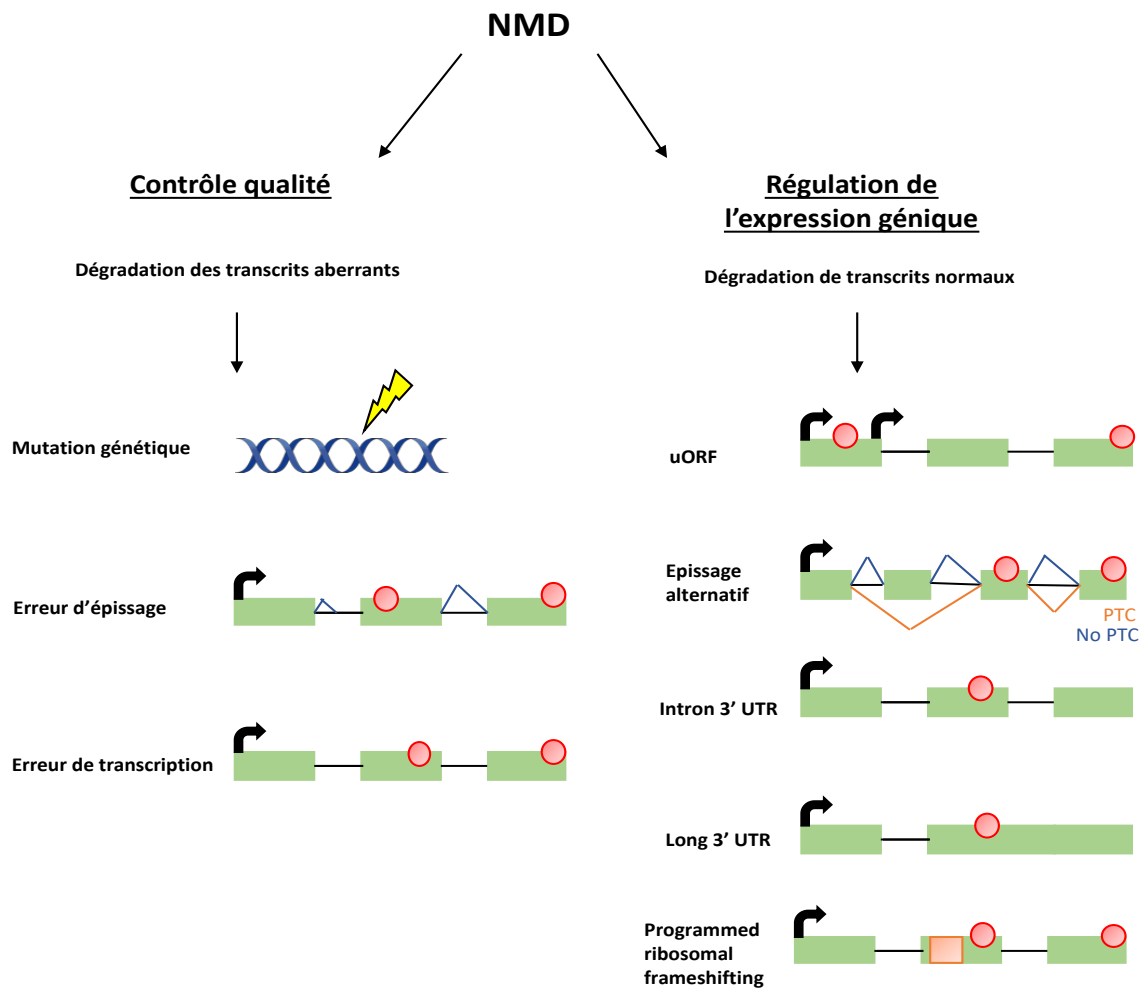


Figure 27 : Le NMD, un contrôle qualité des ARNm et un mécanisme régulant l'expression de gènes physiologiques. Plusieurs phénomènes peuvent aboutir à la formation d'un codon stop prématuré (PTC). Les PTC peuvent se former suite à des mutations géniques ou des erreurs de l'épissage ou de la transcription. Le NMD régule également entre 5 et 10% d'ARNm physiologiques. Dans ce cas, les PTC sont générés par divers événements tels que les uORF, l'épissage alternatif, la présence d'un intron dans la région 3'UTR, une longue séquence 3'UTR, les PRF (*programmed ribosomal frameshifting*) (les rectangles verts représentent les exons, les lignes : les introns, les cercles rouges : les codons stop, les codons d'initiation de la traduction sont représentés par des flèches noires). Modifié d'après (Nickless, Bailis and You, 2017).

3.1.4.3 L'épissage alternatif couplé au NMD

Des analyses bioinformatiques à partir de banques EST (*expressed sequence tag*) ont déterminé qu'environ 35% des transcrits soumis à l'épissage alternatif donnent naissance en des isoformes d'ARNm contenant un codon stop prématuré pouvant être reconnu et dégradés par la voie NMD (Lewis, Green and Brenner, 2003). Ce mécanisme qui permet de réguler l'expression génique de façon post-transcriptionnelle est appelé AS-NMD (*alternatif splicing coupled to NMD pathway*) ou encore RUST (*regulated unproductive splicing and translation*). Plus récemment, Weischenfeldt et ses collaborateurs ont confirmé le lien étroit existant entre le NMD et l'épissage alternatif. En effet, une comparaison du profil d'expression génique entre le tissu hépatique de souris contrôles et de souris n'exprimant pas le facteur Upf2 a été effectuée. Les résultats ont mis en évidence que l'inhibition du NMD entraîne des modifications du profil d'expression de différents facteurs d'épissage (Weischenfeldt *et al.*, 2012).

L'expression de plusieurs facteurs d'épissage est régulée par l'AS-NMD (Lejeune and Maquat, 2005; McGlincy and Smith, 2008). Le facteur d'épissage SC35 qui appartient à la famille des protéines SR (riches en résidus sérines et arginine) est capable de moduler l'épissage de son propre ARNm lorsque cette dernière est présente en grande quantité dans la cellule. Suite à cette modification de l'épissage, le codon stop physiologique se retrouve alors en amont d'une jonction exon-exon. Dans ces conditions, le codon stop du transcrit SC35 est alors reconnu comme étant un PTC activant sa dégradation par la voie NMD (Sureau *et al.*, 2001). D'autres protéines appartenant à la famille SR régulent leur expression par ce même mécanisme (Lareau *et al.*, 2007; McGlincy and Smith, 2008). Le facteur d'épissage PTB autorégule également son expression lorsque cette dernière est surexprimée. PTB appartient à la famille des protéines hnRNP et est capable de réguler l'épissage de son propre ARNm en favorisant l'exclusion son exon 11. Cet événement génère un décalage du cadre de lecture et la formation d'un codon stop prématuré au niveau de l'exon 12 pouvant être reconnu par la voie NMD (Wollerton *et al.*, 2004) (Figure 28).

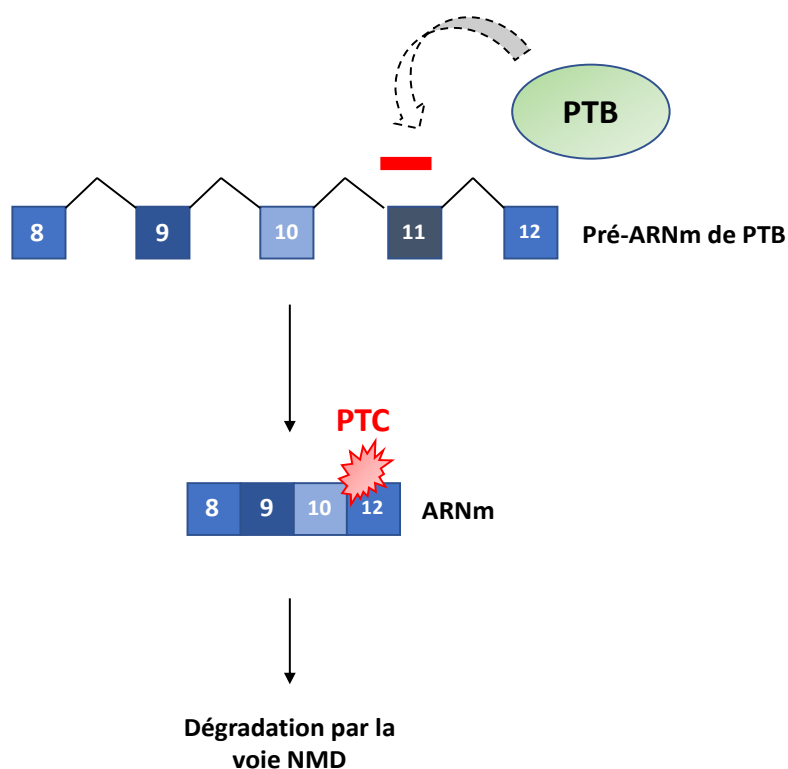


Figure 28 : L'expression de PTB est régulée par la voie NMD. Le facteur d'épissage PTBP1 autorégule son expression en favorisant l'exclusion de l'exon 11. L'exclusion de cet exon entraîne un décalage du cadre de lecture générant un codon stop prématuré dans l'exon 12. Le transcrit est alors reconnu et dégradé par la voie NMD aboutissant à une baisse de l'expression de PTBP1 et régulant, de ce fait, l'épissage cellulaire. *Modifié d'après* (Lejeune and Maquat, 2005).

Certains facteurs d'épissage s'inter-régulent par le mécanisme AS-NMD (McGlinicy and Smith, 2008). C'est notamment le cas de PTBP1 et de son paralogue PTBP2. Ce mécanisme est particulièrement importante car il permet de contrôler des évènements d'épissages alternatif régulant la différenciation neuronale. Dans le cerveau des mammifères, PTBP2 est majoritairement exprimée dans les neurones différenciés tandis que PTBP1 l'est essentiellement dans les cellules indifférenciées (Boutz *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2012; Keppetipola *et al.*, 2016). Les deux protéines sont soumises à l'AS-NMD. En effet, PTBP1 module l'épissage de son propre ARNm favorisant l'exclusion de l'exon 11 (Wollerton *et al.*, 2004) et la formation d'un PTC tandis que PTBP2 promeut l'exclusion de l'exon 10 de son ARNm induisant un décalage du cadre de lecture et la formation d'un PTC (Boutz *et al.*, 2007; McGlinicy and Smith, 2008). Dans les cellules progénitrices neuronales, PTBP1 réprime l'expression de PTBP2 en favorisant l'exclusion de l'exon 10 de PTBP2. Ainsi, les transcrits de PTBP2 contenant

un codon stop prématuré sont reconnus et dégradés par le NMD. Au cours de la différenciation neuronale, l'expression du micro ARN 124 augmente réprimant de ce fait l'expression de PTBP1 (Coutinho-Mansfield *et al.*, 2007; Makeyev *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2018). En conséquence, l'inclusion de l'exon 10 de l'ARNm PTBP2 est favorisée provoquant une augmentation de l'expression du facteur PTBP2. Des travaux ont mis en évidence, à partir de cellules murines indifférenciées traitées à l'acide rétinoïque, que la baisse d'expression de PTBP1 au profit de PTBP2 dans les cellules différenciées induit un changement d'environ 25% de l'épissage alternatif général des transcrits (Boutz *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014; Linares *et al.*, 2015; Vuong *et al.*, 2016).

3.1.5 Implication de DDX5 dans l'activation du NMD

Récemment, une étude a révélé l'implication de l'ARN hélicase DDX5 dans la voie NMD (Geißler *et al.*, 2013). Ces travaux ont montré par immunoprecipitation, à partir d'un lysat de cellules HeLa, que DDX5 interagit avec Upf1, Upf2 et Upf3B ainsi qu'avec d'autres facteurs du NMD tels que PABPN1 et CBP80 de façon ARN dépendante. Il est intéressant de noter que DDX17 est également capable d'interagir avec Upf3B. L'inhibition de l'expression de DDX5 par siRNA a mis en évidence que cette dernière régule sa propre expression ainsi que celles de DDX17 et SMG5. Ce rôle de DDX5 est NMD dépendant car l'inhibition du NMD, par siRNA dirigés contre Upf1, abolit l'effet de DDX5 dans la régulation de l'expression de ces protéines. Il s'avère que la capacité de DDX5 à activer le NMD ne dépend pas de la présence d'un codon stop prématuré au niveau des transcrits des gènes cibles mais de la présence de séquences 3'UTR longues. En effet, les transcrits de DDX5, DDX17 et SMG5 possèdent une longue séquence 3'UTR pouvant être reconnue par la machinerie du NMD. Les auteurs proposent la voie de signalisation suivante afin d'expliquer le fonctionnement de ce mécanisme : DDX5 interagirait avec Upf3B au niveau nucléaire où, ensemble, elles lieraient la séquence 3'UTR de certains ARNm. Ensuite, d'autres protéines régulatrices du NMD pourraient être recrutées au niveau du complexe DDX5-Upf3B telles que Upf2 et Upf1 activant ainsi la machinerie du NMD dans le cytoplasme.

3.1.5.1 *Les autres ARN hélicases impliquées dans le NMD*

De façon intéressante, DDX5 n'est pas la seule hélicase à ARN impliquée dans la dégradation d'ARNm par la voie NMD. La plus connue est l'ARN hélicase Upf1 qui est une protéine clé dans l'activation du NMD. Récemment, il a été démontré que l'ARN hélicase MOV10 participe à l'action de Upf1 dans la déstabilisation de structures secondaires au niveau de l'ARNm et dans le recrutement de protéines régulatrices du NMD (Gregersen *et al.*, 2014). L'ARN hélicase à boîte DEAD eIF4AIII, appartenant au cœur de l'EJC, est impliquée dans le recrutement d'autres protéines régulatrices (Andersen *et al.*, 2006). On peut citer également les ARN hélicases RUVBL1 et RUVBL2 qui s'associent au complexe SURF favorisant la formation du complexe DECID de façon ATPase dépendante (Izumi *et al.*, 2010). On retrouve aussi DHX34, une autre ARN hélicases à boîte DEAD, qui peut s'associer au complexe SURF favorisant son remodelage et la dissociation des facteurs eRF1 et eRF3 (Hug and Cáceres, 2014).

Chapitre 4 : Altérations de DDX5 et du métabolisme des ARN dans les maladies neurodégénératives

DDX5 est une protéine régulatrice clé du métabolisme des ARN. Plusieurs travaux mettent en évidence que les mécanismes régulés par cette dernière sont altérés dans les maladies neurodégénératives et notamment dans les tauopathies. Nous nous attacherons à d'écrire les mécanismes pertinents pour la suite de ce travail.

Au cours de ce chapitre, nous nous intéresserons dans un premier temps au potentiel rôle de DDX5 dans le développement des maladies neurodégénératives puis nous décrirons particulièrement le rôle de l'épissage et du NMD dans le développement de ces pathologies.

I. DDX5 et les tauopathies

Le rôle de DDX5 dans le développement des maladies neurodégénératives a été peu étudié. Toutefois, quelques travaux tendent à mettre en évidence un lien entre cette protéine et les tauopathies. En effet, DDX5 semble être impliquée dans la mise en place de la dystrophie myotonique. Cette tauopathie est caractérisée par l'agrégation, au niveau nucléaire, de transcrits DMPK suite à l'expansion du triplet CTG dans la séquence 3'UTR. De façon intéressante, une co-localisation a été observée entre DDX5 et les expansions CTG dans un modèle cellulaire reproduisant la dystrophie myotonique. DDX5 n'est pas séquestrée au niveau de ces répétitions. Toutefois, elle facilite le recrutement du facteur d'épissage MBNL1 au niveau des répétitions CTG laissant suggérer que DDX5 puisse jouer un rôle dans la séquestration du facteur d'épissage au sein des agrégats (Laurent *et al.*, 2012). Par ailleurs, DDX5 régule l'épissage alternatif de l'exon 10 du transcrit Tau (Kar *et al.*, 2011). Or, des altérations de l'épissage alternatif de Tau peuvent être observées dans certaines tauopathies (D'Souza *et al.*, 1999; Dawson *et al.*, 2007). Par conséquent, ces résultats suggèrent qu'un dysfonctionnement de l'activité régulatrice de DDX5 sur l'épissage pourrait moduler le ratio des isoformes 3R/4R de Tau et ainsi contribuer à la mise en place de ces pathologies.

II. Altération de l'épissage dans les maladies neurodégénératives

Plusieurs études ont mis en évidence des altérations de l'épissage dans les maladies neurodégénératives et notamment dans les tauopathies. Plusieurs protéines constituant le cœur des particules U1 du spliceosome sont délocalisées au niveau du cytoplasme où elles sont présentes dans les agrégats des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Hales, Dammer, *et al.*, 2014; Hales, Seyfried, *et al.*, 2014). De façon intéressante, l'agrégation de ces protéines est associée à des troubles de l'épissage avec l'accumulation d'ARN non épissés (Bai *et al.*, 2013). De plus, la mutation de gènes codant pour les composants des particules U2 génère des troubles de l'épissage couplés à une ataxie et à une dégénérescence neuronale chez la souris (Jia, Mu and Ackerman, 2012). On retrouve des altérations de l'épissage dans d'autres maladies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique (ALS) et les démences fronto-temporales. Ces pathologies sont caractérisées par l'agrégation cytoplasmique des facteurs d'épissage FUS et TDP-43 (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006; Maekawa *et al.*, 2009). La redistribution cytoplasmique de ces protéines se produirait en amont de la formation des dégénérescences neurofibrillaires (Bai, 2018). Par conséquent, les troubles de l'épissage pourraient ne pas être une conséquence de la pathologie mais plutôt un événement participant à la mise en place des tauopathies.

III. Altération du NMD dans les maladies neurodégénératives

Le lien entre la dégradation des ARNm par la voie NMD et le développement des tauopathies a été peu étudié. Cependant, une étude a souligné l'importance de ce mécanisme dans le développement des maladies neurodégénératives à partir de cultures primaires de neurones de rats utilisés comme modèles pour l'étude de l'ALS et des démences fronto-temporales. En effet, la surexpression de Upf1 protège de la toxicité induite par l'agrégation de TDP-43 et FUS au sein des neurones de façon NMD-dépendante. Les mêmes résultats ont été obtenus suite à la surexpression de Upf2 (Barmada *et al.*, 2015). Par ailleurs, des mutations au niveau du gène codant pour la protéine Upf3B, impliquée dans la régulation du NMD, ont été corrélées avec l'apparition de troubles intellectuels chez l'homme tels que des difficultés d'apprentissage, des troubles de l'attention, l'autisme ou encore la schizophrénie. Les auteurs ont également montré que la déplétion de cette protéine entraîne une

réduction de la taille des axones au niveau des neurones hippocampiques chez la souris (Nguyen *et al.*, 2012; Jolly *et al.*, 2013). D'autre part, il a été déterminé que l'inhibition du NMD entraîne une modification globale de l'épissage alternatif chez la souris (Weischenfeldt *et al.*, 2012). Ces modifications sont également observées dans les cerveaux humains âgés ou atteints de la maladie d'Alzheimer ou encore les démences fronto-temporales, différentes conditions où l'on observe des agrégats des protéines Tau non fonctionnelles. De façon intéressante, ces changements ont été corrélés à des modifications d'expression de facteurs d'épissage, tels que SC35 et PTBP1, connus pour être régulés par le système AS-NMD (Tollervey *et al.*, 2011; Wong, 2013).

PARTIE 1

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Tau est une protéine appartenant à la famille des MAPs, initialement décrite comme régulant la dynamique des microtubules au niveau des axones (Weingarten *et al.*, 1975). De plus en plus d'études mettent en évidence que la protéine Tau est finalement impliquée dans de nombreux autres mécanismes selon sa localisation subcellulaire. Par exemple, il s'avère que Tau joue un rôle dans la transmission synaptique au niveau des dendrites (Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012), le transport axonal et le trafic des mitochondries dans les axones (Stamer *et al.*, 2002; Dixit *et al.*, 2008) ou encore la protection des acides nucléiques (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014) et le maintien de l'hétérochromatine péricentromérique au niveau nucléaire (Mansuroglu *et al.*, 2016). Tau est également connue pour interagir *in vitro* avec les ARN (Wang *et al.*, 2006) ainsi qu'avec des protéines impliquées dans la traduction et, plus généralement, dans le métabolisme des ARN suggérant que Tau puisse réguler, du moins en partie, ces mécanismes (Gunawardana *et al.*, 2015; Vanderweyde *et al.*, 2017). Le but de cette étude est de déterminer le rôle potentiel des protéines Tau dans le métabolisme des ARN. Pour cela, nous avons recherché des partenaires de Tau à partir d'un lysat de cellules de neuroblastome SH-SH5Y par une approche TAP (*tandem affinity purification*) couplée à de la spectrométrie de masse. Parmi les partenaires identifiés, nous nous sommes intéressés à DDX5, une ARN hélicase impliquée dans la majorité des étapes du métabolisme des ARN, depuis la transcription à la traduction en passant par la maturation des ARN ou leur dégradation.

Dans ce contexte scientifique, l'étude s'est orientée autour de trois objectifs principaux :

Les travaux présentés dans la première partie visent à confirmer ainsi qu'à caractériser l'interaction entre Tau et DDX5 par l'utilisation de différentes approches *in vitro* et *in cellulo*.

La seconde partie de ce projet a pour objectif de caractériser cette interaction Tau-DDX5 sur le plan fonctionnel. Pour cela, nous nous sommes basés sur les fonctions déjà connues de l'ARN hélicase DDX5 dans le métabolisme des ARN.

La troisième partie de l'étude vise à étudier le comportement du complexe Tau-DDX5 en condition pathologique et plus particulièrement à déterminer l'impact

de la phosphorylation pathologique de Tau, une modification post-traductionnelle déjà connue pour moduler l'activité de cette dernière lors de la mise en place des tauopathies.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. Culture cellulaire

1. Les lignées cellulaires

Les cellules SH-SY5Y sont issues d'une lignée de neuroblastome humain (SH-N-SH) dérivée de métastases localisées au niveau de la moelle osseuse provenant d'une tumeur du système nerveux périphérique. Les cellules HeLa proviennent d'une métastase de tératocarcinome, un cancer épithélial du col de l'utérus. Les cellules ont été prélevées sur une patiente américaine nommée Henrietta Lacks décédée dès suite de son cancer en 1951. La lignée HEK-293T dérive de cellules épithéliales rénales embryonnaires transformées.

2. Entretien des cellules

Les lignées sont maintenues à 37°C dans une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ dans un milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen*) supplémenté en sérum de vœu foetal (10%), en L-glutamine (2mM) et en pénicilline/streptomycine (50U/ml). Lorsque les cellules atteignent 80-90% de confluence, elles sont divisées après lavage au PBS (*Phosphate Buffer Saline*) et décollement par l'action de la trypsine/EDTA puis ajout de milieu de culture complet.

II. Transfection transitoire, siRNA et mesure des activités luciférase et β -galactosidase

Les cellules sontensemencées la veille dans des plaques 24 puits à raison de 90 000 cellules/puits. Elles sont ensuite transfectées lorsqu'elles atteignent 80% de confluence par l'utilisation de la lipofectamine 2000 (Lipofetacmine™ 2000 Transfection Reagent, *Thermofisher*). Un mélange ADN/lipofectamine 2000 dans 100 μ l de milieu DMEM dépourvu en sérum de vœu foetal et en antibiotiques est effectué à raison de 400ng d'ADN pour 1,5 μ l de lipofetacmine 2000 par puits. Ce mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante puis répandu sur les cellules.

Concernant le système simple hybride, les cellules sont transfectées par l'ajout d'un mélange ADN/lipofetacmine 2000 composé des quantités indiquées de plasmide Gal4 (*Clontech*) ou Gal4-Tau 1N4R (*disponible au laboratoire*), 100 ng du plasmide codant

pour le gène rapporteur luciférase (Gal4)₅-TK-Luc (*disponible au laboratoire*), 10 ng de plasmide TH-Renilla luciférase comme contrôle interne et une quantité variable de plasmide vide pcDNA4 (qsp 400ng). La fonctionnalité du système a été testée par la transfection du plasmide Gal4-VP16 (*Clontech*). Pour l'étude concernant la réponse p53, les lignées cellulaires ont été transfectées par un mélange ADN/lipofectamine 2000 composé de 100 ng de plasmide contenant l'élément de réponse à p53 (p53)₁₃-TATA-Luc (*don du Dr. Nicolas Jonckheere, UMR-S 1172, Lille*), 10 ng de plasmide contenant le contrôle interne (Tk-Renilla luciférase, *Promega*), 40 ng de plasmide p53 (pcDNA3-p53, *don du Dr. Anne Chotteau, UMR 8161, Lille*), 100 ng de plasmide Tau (pcDNA3.1-Tau 1N4R, *disponible au laboratoire*) et une quantité variable de plasmide vide (qsp 400 ng).

Pour l'analyse de l'épissage alternatif, les cellules ont été transfectées avec un mélange ADN/lipofectamine 2000 composé de 100 ng de plasmide rapporteur pTN24 (Nasim and Eperon, 2006) (*don du Pr. Eperon, Leicester, UK*) contenant les gènes rapporteurs (SV40-Firefly luciférase et β -galactosidase), 100 ng de plasmide Tau pcDNA3.1-Tau 1N4R (*disponible au laboratoire*) et une quantité variable de plasmide vide pcDNA4 (qsp 400 ng).

L'analyse du NMD a été effectuée par la transfection d'un mélange ADN/lipofectamine 2000 composé de 100 ng de plasmide pCL-neo contenant le gène rapporteur (SV40-Renilla luciférase) fusionné à la β -globine sauvage ou mutée (Boelz *et al.*, 2006) (*don du Pr. Kulozik, Heidelberg, Germany*). Le mélange est constitué également de 20 ng de plasmide CMV-Firefly luciférase comme contrôle interne (*don du Pr. Kulozik Heidelberg, Germany*), 100 ng de plasmide Tau (pcDNA3.1-Tau 1N4R) et une quantité variable de plasmide vide pcDNA4 (qsp 400 ng).

Concernant la recherche des gènes cibles contrôlés par Tau. Les cellules HeLa ont étéensemencées la veille à raison de 500 000 cellules/puits en plaques 6 puits. Les transfections ont été effectuées à l'aide des plasmides suivants : 500 ng de plasmides codant pour Tau (pcDNA3.1-Tau 1N4R) ou Tau P301S (pcDNA3.1-Tau P301S) ou Tau P301L (pcDNA3.1-Tau P301L) et de 700 ng plasmide contrôle (pcDNA4) (qsp 1200ng).

Concernant la transfection des siRNA, les cellules ont été transfectées grâce à l'utilisation de l'agent de transfection DHarmaFECT (*GE Healthcare*). Un mélange siRNA / Dharmafect dans 100 µl de milieu DMEM dépourvu de sérum de vœu foetal et d'antibiotiques est réalisé à raison de 25nM de siRNA pour 0,8 µl de Dharmafect par puits. Les différents systèmes rapporteurs sont ensuite transfectés dans les cellules, 24 h plus tard, en utilisant la lipofectamine 2000 (voir méthode ci-dessus).

Les cellules sont récupérées 48 h à 72 h après les transfactions pour analyses. Les transfactions utilisant les luciférases *Renilla* et *Firefly* ont été analysées à l'aide du système Dual-Luciferase Reporter Assay System (*Promega*). Le kit Dual-Light System (*Applied Biosystems*) a été utilisé pour la luciférase *Firefly* et la β-galactosidase, selon les recommandations des fournisseurs. Les mesures sont réalisées en triplicate sur 3 expériences indépendantes et exprimées en unités arbitraires.

L'amplification de l'ensemble des plasmides a été réalisée dans les bactéries *Escherichia coli* (One Shot™ Top10 chemically competent, *ThermoFisher*). Les plasmides ont ensuite été extraits et purifiés à l'aide du Kit NucleoBond Xtra midi (*Macherey Nagel*) selon les recommandations du fournisseur.

III. Mutagénèse dirigée

Les mutations du domaine riche en proline (PRD) de Tau et les mutants phosphomimétiques ou non phosphomimétiques de Tau ont été effectués à l'aide du kit Q5 site-directed mutagenesis (*New England Biolabs*). Pour cela, 25 ng de plasmide parental (GST-PRD ou pcDNA3.1 Tau-1N4R) sont ajoutés à 12,5 µl de tampon 2X Master mix, 0,5 µM d'amorce sens, 0,5 µM d'amorce anti-sens et de l'eau certifiée sans nucléases (qsp 9 µl). Le plasmide est ensuite amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dans un thermocycleur (*Applied Biosystems*) selon les conditions suivantes : dénaturation 30 sec à 98°C suivie de 25 cycles (10 sec à 98°C, 30 sec X°C, à 72°C) et d'une élongation finale 2 min à 72°C. Afin de digérer le plasmide parental, l'enzyme de restriction KLD est ajoutée dans la solution d'amplification pendant 1 heure à température ambiante.

Le plasmide muté est ensuite amplifié par transformation dans les bactéries chimiquement compétentes fournies avec le kit selon les recommandations du

fournisseur. La réaction de transformation est ensuite étalée sur un milieu LB-agar (Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 10mM, NaOH 2mM, Agar 2%) rendu sélectif par l'addition d'ampicilline (50 µg/ml) et incubée une nuit dans une étuve à 37°C. L'efficacité de la mutagenèse n'étant pas de 100%, un criblage des clones obtenus le lendemain est nécessaire. Pour cela, quelques clones sont piqués et amplifiés dans 5 ml de milieu LB rendu sélectif par l'addition d'ampicilline (50µg/ml). Les plasmides ainsi amplifiés sont alors extraits et purifiés à l'aide du kit NucleoBond Xtra mini (*Macherey Nagel*). Les plasmides sont ensuite séquencés par la compagnie GATC Biotech. Les résultats du séquençage des plasmides codant le domaine riche en proline muté, les mutants phosphomimétiques et non phosphomimétiques sont analysés grâce au logiciel Multalin (Corpet, 1988).

IV. GST-pulldown

Des bactéries *Eschericia coli* (BI21, *Invitrogen*) sont transformées par des vecteurs pGEX (*GST Gene Fusion System*) codant pour la protéine Tau fusionnée à la GST (Glutathion S-transferase) (don du Dr. Jean-Charles Lambert, *U1167, Lille*) ou des mutants de délétions Tau ainsi que le PRD muté K224G, K225G, K234G. Les réactions de transformation sont ensuite étalées sur un milieu LB-agar (Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 10 mM, NaOH 2 mM, Agar 2%) rendu sélectif par l'addition d'ampicilline (50 µg/ml) et incubées une nuit dans une étuve à 37°C. Quelques colonies isolées sont piquées et inoculées dans 5 ml de milieu LB rendu sélectif par l'addition d'ampicilline (50 µg/ml) puis placées dans une étuve sous agitation (120 rpm) à 37°C durant toute la nuit. Les précultures sont ensuite diluées dans 200 ml de milieu LB supplémenté en ampicilline (50 µg/ml) et incubées à 37°C sous agitation (120 rpm). Lorsque la densité optique à 600 nm des cultures atteint des valeurs situées entre 0,3 et 0,6, l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée à la GST est induite par l'ajout d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside, *Roche*) à la concentration finale de 1 mM. Les cultures sont ensuite incubées 4 heures supplémentaires à 37°C sous agitation (120 rpm). Les bactéries sont finalement collectées par centrifugation (6000g, 15 min, 4°C). Elles sont alors lysées dans du tampon de lyse composé de PBS 1X, triton 0,1% suivi d'une sonication sur glace. Les lysats sont centrifugés (13000 rpm, 15 min, 4°C) et les surnageants contenant les protéines de fusion sont collectés. La production des protéines de fusion est analysée par électrophorèse sur gel SDS-Page (méthode décrite dans la sous-partie VIII du matériels et méthodes) et visualisée à l'aide d'une

coloration au bleu de coomassie.

Dans le but de produire *in vitro* la protéine DDX5, un plasmide codant pour DDX5 (plasmide pSG5-DDX5, don du Pr. Fuller-Pace, University of Dundee, UK) est utilisé dans un lysat de réticulocyte, un système de synthèse *in vitro* de protéines eucaryotes (TnT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System, *Promega*) selon les recommandations du fournisseur.

La résine Glutathion sepharose 4B (*Sigma-Aldrich*) est équilibrée dans du tampon de lyse (PBS 1X, triton 0,1%). Les protéines d'intérêt fusionnées à la GST sont ensuite incubées 1 h à 4°C avec la résine. La résine, ainsi chargée en protéines de fusion, est lavée à 2 reprises par du tampon de lyse puis 2 nouvelles fois par du tampon de lavage (Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, NP40 0,01%, DTT 1 mM). La résine est alors remise en suspension dans 500 µl de tampon de lavage. Le lysat de réticulocyte (3,5 µl) contenant la protéine DDX5 synthétisée *in vitro* est ensuite incubé avec la résine 1 h 30 min à 4°C sous agitation puis la résine est lavée à 3 reprises par du tampon de lavage. Enfin, les complexes protéiques sont élués dans un tampon de charge composé de LDS 3X (Lithium Dodécyl Sulfate, *Invitrogen*) supplémenté en agent réducteur (*Invitrogen*).

V. Phosphorylation *in vitro*

La phosphorylation *in vitro* a été effectuée par la formation d'un mix composé de 1 µM de protéines de fusion GST-Tau avec 25 µl de tampon B (Hepes 40 mM, EGTA 5mM, MgCL2 2mM DTT 2 mM), 1 µM d'acide okadaïque (*SIGMA*), 2 mM d'ATP (*Tocris*) et 20 µl d'extrait de cerveau de rat. Ce mix a été incubé à 37°C pendant une nuit sous agitation faible.

VI. Streptavidine-pulldown

Les expériences de Streptavidine-pulldown ont été menées à partir de cellules appartenant à la lignée SH-SY5Y sur-exprimant de manière stable la protéine Tau fusionnée à un tag composé de deux domaines d'affinité en tandem : le *Streptavidin Binding Peptide* et le *Calmodulin Binding Peptide*. Les cellules sont récoltées par trypsinisation (méthode décrite dans la section I du matériels et méthodes) puis lavées

2 fois dans du PBS (Centrifugation : 5 min, 1100g, 4°C). Le tampon de lyse composé de Tris-HCl 25 mM pH 7,9, KCL 10 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM et anti-protéase (complete, Mini, *Roche*) est ajouté au culot cellulaire. Ce dernier est resuspendu puis incubé 15 min dans la glace. Au terme de l'incubation, du Triton X-100 et une solution de NaCl sont ajoutés à la suspension aux concentrations finales respectives de 0,1% et de 340mM. Le lysat est alors incubé 1 h sous agitation à 4°C. Enfin, l'extrait cellulaire est obtenu par centrifugation 15 min, à 13000 rpm et 4°C.

L'extrait cellulaire est ensuite dilué au tiers par ajout d'un tampon de dilution (Tris-HCl 25 mM pH 7,9, EDTA 0,1 mM, NP-40 0,01%). En parallèle, la résine (Dynabeads M-270 Streptavidin, *Life Technologies*) est équilibrée à l'aide d'un tampon d'équilibration (Tris-HCl 50 mM pH 7,9, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, NP-40 0,05%). Puis, l'extrait cellulaire est incubé avec la résine toute la nuit, à 4°C sous agitation. Le lendemain, la résine est lavée à 3 reprises à l'aide du tampon d'équilibration. Enfin, les complexes protéiques sont élués dans un tampon de dépôt composé de LDS 3X (Lithium Dodécyl Sulfate, *Invitrogen*) et d'un agent réducteur (Sample Reducing Agent, *Invitrogen*).

Pour tester l'effet des ARN sur l'interaction entre Tau et DDX5, le lysat est incubé avec 500 ng de RNase A (*Roche*) pendant 1 h sous agitation à température ambiante avant d'être incubé avec la résine sur la nuit.

Pour tester l'impact de l'ARN long non codant SRA sur l'interaction entre Tau et DDX5, les cellules ont été transfectées pendant 48 heures avec un plasmide vide (pcDNA4) ou codant pour SRA (pcDNA 3.1) Les cellules ont ensuite été récupérées suivi d'un Streptavidine-pulldown comme décrit précédemment. L'ARN long non codant H19 a été utilisé comme contrôle négatif par transfection du plasmide codant pour H19 (pcDNA 3.1).

VII. Immunofluorescence

1. Immunofluorescence sur coupes cérébrales en paraffine

Les échantillons cérébraux ont été obtenus par Lille NeuroBank du Centre de Ressources Biologiques du CHU de Lille. Lille NeuroBank est déclarée au Ministère

de la recherche française depuis le 14 août 2008 sous la référence DC-2000-642. Elle remplit les critères législatifs concernant les ressources biologiques incluant un comité d'éthique médical et la protection des données.

Les coupes sagittales de cerveau sont déparaffinées puis démasquées à l'aide du tampon citrate, constitué de citrate d'acide 3,75 mM et de phosphate disodique 2,5 mM, pendant 10 min dans un four à micro-ondes domestique. Afin de bloquer les sites non spécifiques, les coupes sont incubées pendant 1 h à température ambiante dans du sérum de cheval dilué au 1/100 dans du PBS/triton 0,2% (*Vector Laboratories*). Après cette submersion, les anticorps primaires sont incubés pendant la nuit à 4°C en présence de PBS/triton 0,2% à l'aide des anticorps suivants : AT8 (*Thermo Scientific*) et DDX5 (*Abcam*). L'anticorps AT8 reconnaît la protéine Tau phosphorylée à l'épitope Ser202 et Thr205. Après 2 lavages au PBS/triton 0,2%, les anticorps primaires sont ensuite révélés par l'incubation des coupes avec des anticorps secondaires couplés à Alexa 488 ou 568 (*Life Technologies*). Le montage des coupes est effectué à l'aide de la solution Vectashield / DAPI (*Vector Laboratories*). Les coupes sont ensuite analysées avec un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM710 (grossissement 40 fois).

2. Immunocytochimie

Des lamelles en verre rondes sont déposées au fond des puits de plaques 24 puits puis les cellules sontensemencées à raison de 200 000 cellules par puits.

Les lamelles sont rincées 3 fois au PBS puis incubées 20 minutes à température ambiante avec du paraformaldéhyde 4% (PAF). Les lamelles sont ensuite rincées par 3 lavages à l'aide du tampon de lavage composé de NH₄Cl 50 mM et PBS/BSA 1% pendant 5 min à température ambiante. Les cellules sont perméabilisées par incubation avec du triton 0,1% préparé dans du PBS/BSA 1% pendant 10 minutes. Les anticorps primaires sont ensuite ajoutés après dilution dans du PBS/BSA 1% pendant la nuit à 4°C. Les anticorps utilisés sont AT8 (*Thermo Scientific*), AT180 (*ThermoFisher*) et Tau-Cter (maison). Ces anticorps reconnaissent respectivement la protéine Tau au niveau des épitopes Ser202, Thr205 et Thr231, Ser235 phosphorylées ou la partie C-terminale de Tau indépendamment de son état de phosphorylation. Le

lendemain, les anticorps primaires sont révélés à l'aide des anticorps secondaires Alexa dilués au 1/400 dans du PBS/BSA 1% (*Life technologies*). Un dernier lavage de 5 min est effectué puis les lamelles sont montées sur lames par l'ajout du milieu de montage Vectaschield / DAPI (*Vector Laboratories*). Les lames sont finalement analysées au microscope confocal.

3. Proximity Ligation Assay (PLA, Duolink)

Les expériences de Proximity Ligation Assay (Duolink, *Sigma-Aldrich*) ont été menées sur des cellules SH-SY5Yensemencées au sein d'un système de chambres de culture Lab-Tek (*ThermoFisher Scientific*) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les cellules sont lavées avec du PBS puis fixées à l'aide d'une solution de PAF à 4% pendant 30 min. Les chambres sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées à l'aide d'une solution de PBS/triton 0,2% puis lavées à 2 reprises dans du PBS pendant 10 min. Afin de bloquer les sites non-spécifiques, une solution saturante de sérum de cheval (diluée au 1/100^e dans du PBS) est incubée 1 h dans les chambres. Les anticorps primaires sont ensuite dilués dans une solution de PBS/triton 0,2% et incubés pendant la nuit à 4°C. Le lendemain, les chambres sont lavées 2 fois pendant 5 min par du tampon de lavage A (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%, pH 7,4). En parallèle, les anticorps secondaires couplés à un oligonucleotide (sondes PLA) sont dilués au 1/5^e dans du tampon de lavage A puis incubés pendant 1 h à 37°C. Les Lab-Tek sont ensuite lavées 2 fois avec du tampon de lavage A pendant 5 min sous une légère agitation puis elles sont incubées avec une solution de ligation pendant 30 min à 37°C. Après 2 lavages de 5 min avec le tampon de lavage A, une solution d'amplification contenant la polymérase est incubée pendant 100 min à 37°C. A l'aide du tampon de lavage B (Tris 0,2 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5), 2 lavages de 10 min sont ensuite effectués. Enfin, l'étape finale consiste à monter les lames à l'aide d'une solution de montage contenant du DAPI (4'6'-diamidino-2-phénylindole, *SIGMA*). Les analyses sont réalisées au microscope confocal.

VIII. Préparation des ARN et qPCR en temps reel

Les ARN totaux sont extraits des cellules à l'aide du kit d'extraction nucleospin RNA (*Macherey nage!*). Les ARN purifiés sont ensuite ajustés à 500 ng par conditions et

une reverse transcription est réalisée avec le kit High-Capacity cDNA reverse transcription (*Applied Biosystem*) selon les recommandations du fournisseur. Les ADN complémentaires obtenus sont alors analysés par qPCR en temps réel selon la technologie Taqman en suivant les instructions du fournisseur. La réaction est effectuée et analysée par le thermocycleur StepOnePlus (*Applied Biosystem*).

IX. Analyse biochimique

1. *Electrophorèse monodimensionnelle*

Afin de séparer les protéines selon leur masse moléculaire, les échantillons sont préparés dans des conditions dénaturantes et réductrices. A cet effet, les échantillons sont dilués dans un tampon de charge constitué de LDS 3X (NuPage Lithium Dodecyl Sulfate Sample Buffer, *Invitrogen*) et d'un agent réducteur (*Invitrogen*). Les protéines contenues dans les échantillons sont analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, technique dite SDS-PAGE. Les électrophorèses sont réalisées avec un système NuPAGE (*Invitrogen*). Les gels utilisés sont des gels pré-coulés NuPAGE Novex Bis-Tris qui présentent un gradient d'acrylamide de 4 à 12 %. Le tampon de migration utilisé est le MOPS SDS Running buffer (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique 50 mM, Tris Base 50mM, SDS 0,1%, EDTA 1mM, pH 7.7, *Invitrogen*). Après avoir déposé les échantillons dans les puits du gel, la migration a lieu sous l'action d'un champ électrique à tension constante (200 V) pendant 60 min.

2. *Western blot*

Au terme de la migration électrophorétique, les protéines incluses dans le gel de polyacrylamide vont être soumises à un électro-transfert horizontal sur une membrane de nitrocellulose dont la porosité est de 0,45 μm (*Hybond, GE HealthCare*). Ce transfert s'effectue dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 190 mM, ethanol 20%) sous une tension appliquée aux bornes des électrodes de 30V pendant 90 min. La qualité du transfert est contrôlée par une coloration réversible des protéines transférées sur les membranes au rouge Ponceau (acide trichloroacétique 3%, rouge Ponceau 0,2%). Le colorant est ensuite éliminé au travers d'un lavage par une solution tampon TNT (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%). L'étape suivante consiste à saturer les sites non-spécifiques par incubation de la membrane dans du

TNT auquel a été ajouté de la poudre de lait 5% pendant 45 min à température ambiante. Les membranes sont de nouveau incubées avec du tampon TNT-lait 5% dans lequel a été ajouté l'anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt pendant une nuit à 4°C sous agitation. La dilution optimale de l'anticorps primaire est déterminée empiriquement à partir des recommandations du fournisseur (Tableau 1).

Nom	Epitope	Origine	Fournisseur	Dilution
Anti-Tau C-ter	15 derniers AA C-terminaux	lapin	<i>maison</i>	1/10 000
DDX5	C-terminal	lapin	<i>Abcam</i>	1/5000
DDX17	AA 485-641 proche de la région C-terminale	souris	<i>Santa-cruz</i>	1/1000
actine	N-terminal	souris	<i>Sigma</i>	1/10 000
Upf1	N-terminal	lapin	<i>Abcam</i>	1/10 000
Upf3B	N-terminal	lapin	<i>Santa cruz</i>	1/200
CBP80	Proche du domaine N-terminal	lapin	<i>Cell signaling</i>	1/1000

Tableau 2 : Récapitulatif des anticorps utilisés au cours de cette étude

Après 3 lavages de 10 minutes dans du TNT, les membranes sont incubées pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation dans du TNT additionné d'un anticorps secondaire (*Vector laboratories, INC*) dilué selon les recommandations du fournisseur. L'anticorps secondaire est conjugué à une enzyme peroxydase et est spécifique des immunoglobulines de l'animal dans lequel a été produit l'anticorps primaire. Les membranes sont ensuite lavées à 3 reprises pendant 10 min dans du TNT sous agitation. Elles sont finalement incubées pendant 1 min dans une solution d'ECL (*Amersham enhanced chemiluminescence Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare*). Le complexe antigène / anticorps est révélé par l'émission de photons provenant de la réaction de chemiluminescence entre les peroxydases et

le luminol contenu dans l'ECL. Ce signal est détecté par le système LAS4000 et les données sont analysées par le logiciel ImageJ.

X. Analyses statistiques

Les données sont exprimées sous forme d'une moyenne et d'un écart-type. La significativité des différences entre les groupes est évaluée grâce aux tests statistiques suivants : le test Mann-Whitney ou le test ANOVA réalisés sur le logiciel prism (*graphpad software*). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

RÉSULTATS

I. Validation de l'interaction Tau-DDX5

1. Tau interagit avec DDX5 et DDX17

Afin de valider l'interaction entre la protéine Tau et DDX5, nous avons tout d'abord utilisé la technique de streptavidine-pulldown. Pour cela, des extraits cellulaires totaux ont été préparés à partir d'une lignée cellulaire stable SH-SY5Y ayant intégrée le plasmide pCTAP vide (SY5Y) ou le plasmide pCTAP codant pour la protéine Tau fusionnée au Tag SBP/CBP (*Streptavidin Binding Protein ; Calmodulin Binding Protein*) (SY5Y-Tau). Les extraits totaux ont été ensuite incubés 8 à 12 h en présence d'une résine streptavidine. **Sur la figure 1A**, nous pouvons voir que DDX5 co-précipite spécifiquement en présence de la protéine Tau. De la même manière, l'ARN hélicase DDX17 pouvant s'associer sous forme d'hétérodimère avec DDX5, est détectable uniquement dans les extraits contenant la protéine Tau fusionnée au Tag SBP/CBP (SY5Y-Tau).

Nous avons ensuite cherché à confirmer l'interaction entre Tau et DDX5 *in vitro* par la technique de GST-pulldown. Pour cela, nous avons utilisé une protéine DDX5 synthétisée *in vitro* à partir d'un lysat de réticulocyte de lapin et une protéine Tau fusionnée à la glutathion transférase (GST) produite chez *e. coli*. Les résultats observés sur **la figure 1B** mettent en évidence une interaction entre ces deux protéines *in vitro*.

Finalement, nous avons étudié l'interaction Tau-DDX5 dans un système cellulaire à l'aide de la technique de Proximity Ligation Assay (PLA). Cette technique permet d'obtenir un signal punctiforme lorsque deux antigènes d'intérêt sont très proches (proximité de moins de 40 nm). Dans les cellules SH-5YSY, nous observons plusieurs spots rouges correspondant à une proximité étroite entre Tau et DDX5 au niveau du cytoplasme et du noyau (**Figure 1C**).

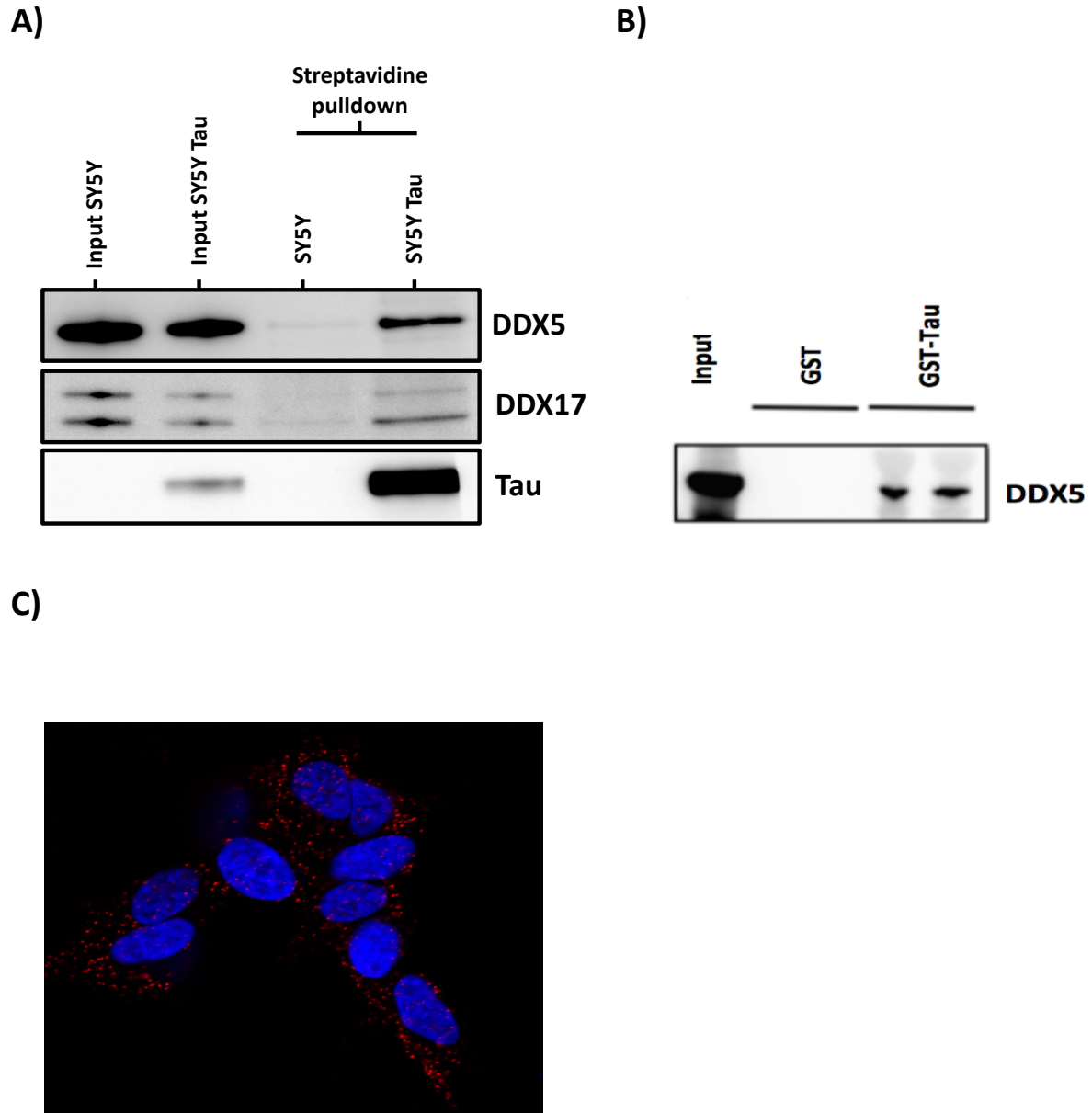


Figure 1 : Tau interagit avec DDX5 et DDX17. **A)** Résultat représentatif du streptavidine-pulldown réalisé à partir d'extraits totaux de lignées cellulaires sur-exprimant (SY5Y Tau) ou non (SY5Y) la protéine Tau fusionnée au tag *streptavidine* et révélé par western-blot à l'aide des anticorps anti-DDX5, anti-DDX17 ou anti Tau-Cter. (N=3 expériences indépendantes) **B)** Résultat représentatif du GST-pulldown obtenu avec la protéine DDX5 synthétisée *in vitro* et la protéine Tau fusionnée au tag GST (GST-Tau) ou la GST seule et révélé par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-DDX5. (N=3 expériences indépendantes) **C)** Détection, par PLA, d'un signal punctiforme cytoplasmique et nucléaire de co-localisation des 2 anticorps anti-Tau/anti-DDX5 dans les cellules SH-SY5Y. (N=3 expériences indépendantes)

2. L'interaction Tau-DDX5 est ARN dépendante

Il est connu que l'interaction entre DDX5 et d'autres protéines peut être régulée par la présence d'ARN (Yao *et al.*, 2010; Geißler *et al.*, 2013). C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de la présence d'ARN ou non sur l'interaction entre les protéines Tau et DDX5. Pour cela, des extraits cellulaires totaux ont été préparés à partir des lignées stables SY5Y ou SY5Y-Tau décrites précédemment. Les extraits ont été ensuite incubés entre 8 et 12 h avec une résine streptavidine après une pré-incubation de 1 h en présence ou non de RNase. Comme montré précédemment, la protéine DDX5 co-précipite spécifiquement en présence de la protéine Tau. Cependant, on peut observer une augmentation de la quantité de DDX5 précipitée (3 fois plus) après la pré-incubation avec la RNase (**Figure 2**). Ainsi, la présence d'ARN semble déstabiliser le complexe Tau/DDX5.

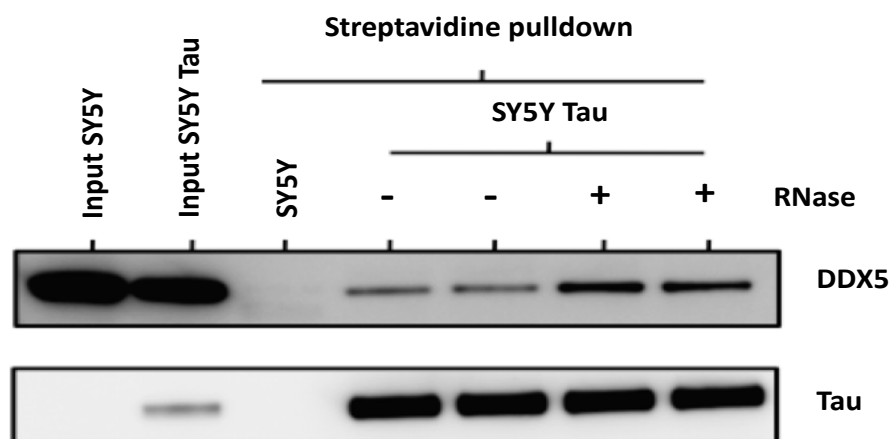


Figure 2 : L'interaction Tau-DDX5 est ARN-dépendante. Résultat représentatif du streptavidine-pulldown réalisé à partir d'extraits cellulaires sur-exprimant (SY5Y Tau) ou non (SY5Y) la protéine Tau fusionnée au tag streptavidine en présence (RNase +) ou non (RNase -) de RNase et révélé par western-blot à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti Tau-Cter. (N=3 expériences indépendantes)

3. Implication de l'ARN long non codant SRA dans l'interaction Tau-DDX5

Suite à ces résultats, nous avons testé l'implication de l'ARN long non codant SRA dans l'interaction Tau-DDX5 car cet ARN est déjà connu pour moduler l'interaction entre DDX5 et l'insulateur chromatinien CTCF (Yao *et al.*, 2010). Pour cela, nous avons effectué de nouveau un streptavidine-pulldown à partir des lignées stables SY5Y ou SY5Y-Tau après avoir transfecté les cellules pendant 48 heures avec un plasmide codant pour l'ARN long non codant SRA (SRA) ou un plasmide vide (CTL).

Nous avons contrôlé la surexpression de l'ARN long non codant SRA par qPCR dans les deux lignées utilisées. Les résultats montrent que SRA est bien surexprimé dans les lignées SY5Y et SY5Y-Tau après 48 heures de transfection (**Figure 3A**). **Sur la Figure 3B**, l'analyse par western-blot met en évidence que la surexpression de l'ARN long non codant SRA n'a pas d'effet sur l'expression de DDX5.

Les résultats obtenus par la technique de streptavidine-pulldown montrent que l'interaction entre Tau et DDX5 est renforcée lorsque l'ARN long non codant SRA est surexprimé (SRA) par rapport à la condition contrôle (CTL) (47% d'augmentation de l'interaction en présence de SRA) (**Figure 3C**). Cette même expérience a été répétée après surexpression de l'ARN long non codant H19, utilisé ici comme contrôle négatif. De façon inattendue, H19 semble déstabiliser partiellement l'interaction entre Tau et DDX5 (**Figure 3D**). Ces résultats suggèrent que certains ARN puissent réguler négativement l'interaction entre les deux protéines, à l'image des résultats obtenus après nos traitements à la RNase (**Figure 2**), tandis que d'autres, comme SRA, pourraient la renforcer.

L'ensemble des résultats, obtenus dans cette première partie, permettent de valider l'interaction Tau-DDX5 *in vitro* et *in cellulo* dont la stabilité est régulée par la présence des ARN. Nous avons également montré que l'ARN hélicase DDX17 est associée au complexe.

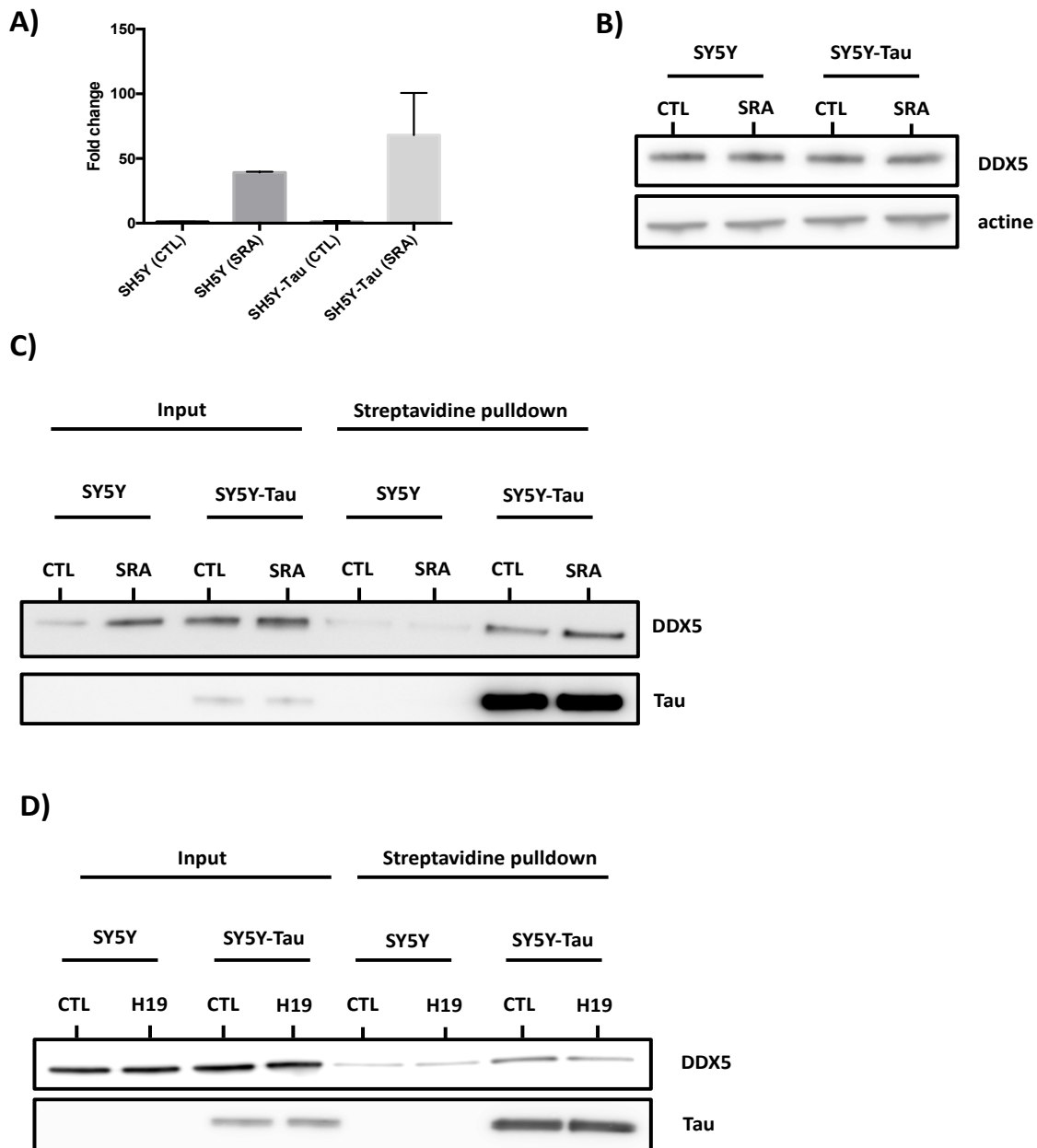


Figure 3 : L'interaction Tau-DDX5 est régulée par l'ARN long non codant SRA. A). Analyse de l'expression de l'ARN long non codant SRA par qPCR après surexpression de SRA (SRA) ou d'un plasmide vide (CTL) dans les cellules de neuroblastome sur-exprimant (SH5Y-Tau) ou non (SH5Y) la protéine Tau. **B).** Étude du niveau d'expression de DDX5 par western-blot sur les cellules SH5Y-Tau et SY5Y, sur-exprimant (SRA) ou non (CTL) l'ARN long non codant SRA, et révélé à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti-actine. **C).** Résultat représentatif du streptavidine-pulldown réalisé à partir d'extraits cellulaires sur-exprimant (SY5Y Tau) ou non (SY5Y) la protéine Tau fusionnée au tag straptavidine après surexpression (SRA) ou non (CTL) de l'ARN long non codant SRA. La révélation a été effectuée par western-blot à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti Tau-Cter. (N=3 expériences indépendantes) **D).** Résultat du streptavidine-pulldown effectué à partir des cellules SY5Y Tau et SY5Y après surexpression (H19) ou non (CTL) de l'ARN long non codant H19. La révélation a été effectuée par western-blot à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti Tau-Cter. (N=1)

II. Caractérisation de l'interaction Tau-DDX5

1. Motif minimal d'interaction entre Tau et DDX5

Nous avons utilisé la technique de GST-pulldown afin d'identifier le motif minimal d'interaction entre Tau et DDX5. Pour cela, nous avons utilisé une protéine DDX5 synthétisée *in vitro*, comme décrit précédemment, et des protéines de fusion GST-Tau tronquées, disponibles au laboratoire. La protéine Tau ainsi que les différents mutants de délétion contenant soit le domaine N-terminal composé des exons 2 et 3 (1-152), soit le domaine riche en proline (153-243), soit le domaine C-terminal composé des 4 motifs de liaison aux microtubules (244-441) ont été testés (**Figure 4A**).

Les résultats montrent que DDX5 interagit spécifiquement avec la protéine Tau pleine taille (1-441) et avec le domaine riche en proline de Tau (fragment 153-243) (**Figure 4B**). Cependant, aucune interaction n'est observée entre DDX5 et les domaines N et C-terminaux de Tau correspondant respectivement aux fragments 1-152 et 244-441.

Afin de déterminer plus précisément le motif d'interaction entre Tau et DDX5, nous avons réalisé de nouveau un GST-pulldown en utilisant la protéine DDX5 synthétisée *in vitro* et différents mutants de délétion du domaine riche en proline de Tau. Comme montré précédemment, le domaine riche en proline de Tau (153-243) interagit avec DDX5 (**Figure 4C**) tandis qu'une absence d'interaction a été obtenue pour les différents mutants testés : 153-224, 153-199, 153-182. Ainsi, l'interaction entre les deux protéines est abolie dès la délétion des 19 acides aminés situés en C-terminal du domaine riche en proline.

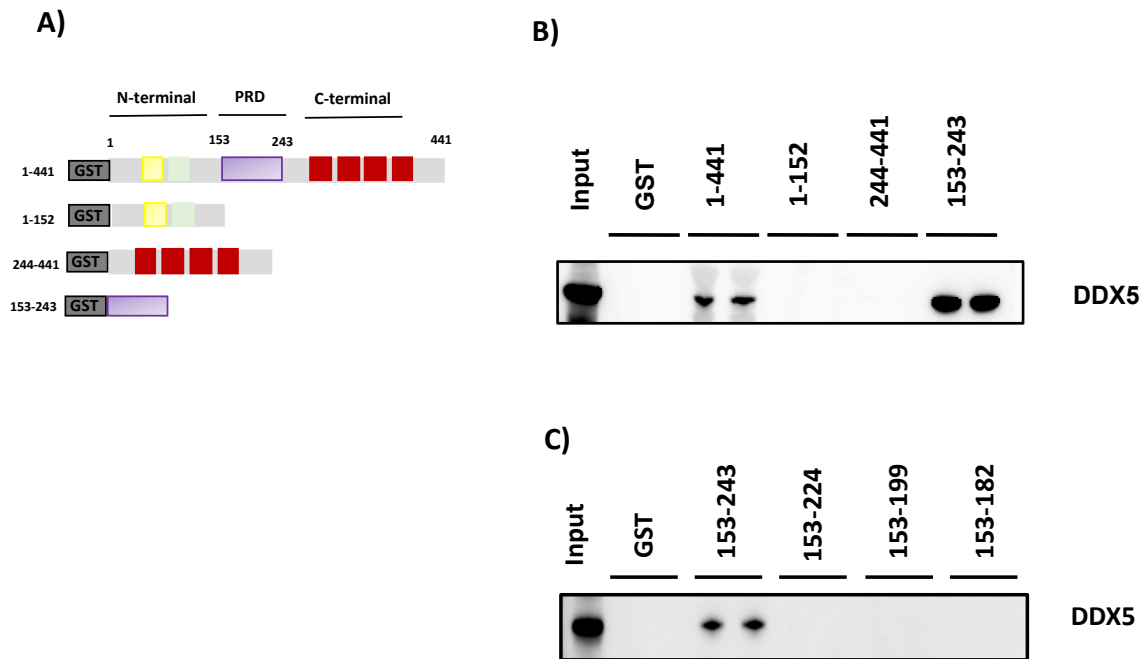


Figure 4 : Domaine minimal d'interaction entre Tau et DDX5. A) Schéma des différentes protéines de fusion utilisées pour le GST-pulldown (*PRD* : *proline rich domaine*). **B)** Résultat représentatif du GST-pulldown obtenu à partir de DDX5 synthétisé *in vitro* et des différents mutants de délétion de Tau fusionnés à la GST et révélé par western-blot à l'aide de l'anticorps anti-DDX5. (N=3 expériences indépendantes) **C)** Résultat représentatif du GST-pulldown effectué avec DDX5 produite *in vitro* et des différents mutants de délétion du domaine riche en proline de Tau fusionnés à la GST et révélé par western-blot à l'aide de l'anticorps anti-DDX5. (N=3 expériences indépendantes)

2. Recherche d'acides aminés impliqués dans l'interaction Tau-DDX5

Des études d'alignement de séquences nous ont révélé que le domaine riche en proline de Tau possède un grand nombre d'acides aminés basiques conservés. Afin de déterminer les acides aminés impliqués dans l'interaction entre Tau et DDX5, nous avons substitué les lysines K224, K225 et K234 en glycine. Puis, nous avons testé la capacité de ce mutant à interagir avec DDX5 par la technique de GST-pulldown.

Comme précédemment, les résultats mettent en évidence que DDX5 interagit avec la protéine de fusion GST couplée au domaine riche en proline de Tau (153-243) tandis qu'une forte diminution du signal est observée en présence du domaine muté (K224G, K225G, K234G) (3 fois moins après quantification) (**Figure 5**). Les lysines K224, K225

et K234, localisées dans la partie C-terminale du domaine riche en proline de Tau, sont donc impliquées dans l'interaction entre Tau et DDX5.

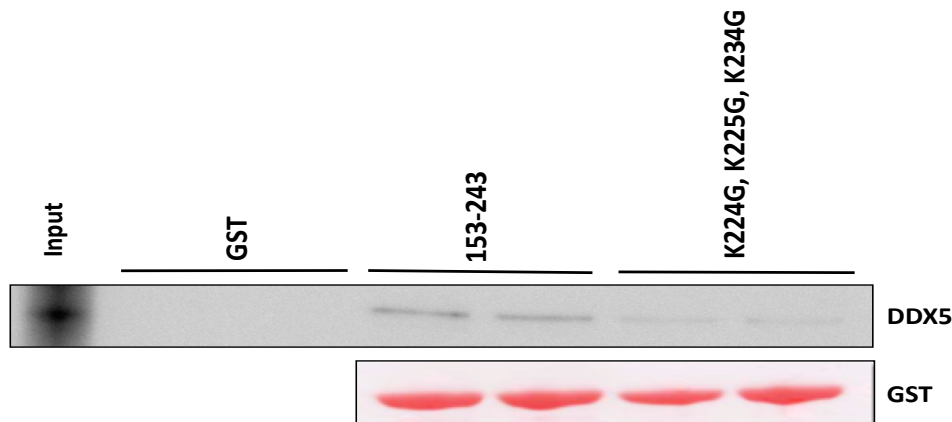


Figure 5 : Les lysines K224, K225 et K234 sont impliquées dans l'interaction Tau-DDX5. Résultat représentatif du GST-pulldown obtenu entre DDX5 produite *in vitro* et du domaine riche en proline de Tau sauvage (153-243) ou muté (K224G, K225G, K234G) fusionné à la GST et révélé par western blot à l'aide de l'anticorps anti-DDX5. Les bandes rouges correspondent aux différentes protéines GST après transfert sur la membrane de nitrocellulose et révélées par coloration au rouge ponceau. (N=3 expériences indépendantes)

III. Caractérisation fonctionnelle de l'interaction Tau-DDX5

Afin de caractériser fonctionnellement l'interaction Tau-DDX5, nous nous sommes basés sur les fonctions déjà connues de DDX5 dans la transcription, l'épissage et dans la dégradation des ARN par la voie NMD.

1. Étude des protéines Tau dans la transcription

L'implication de la protéine Tau dans la transcription a été testée dans un premier temps à l'aide d'un système simple hybride dans lequel la protéine Tau a été fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN Gal4 (Gal4-Tau). Nous avons contrôlé la fonctionnalité de notre système par l'utilisation d'un plasmide codant pour le domaine de liaison à l'ADN Gal4 seul ou fusionné au domaine transactivateur VP16 (Gal4-VP16). Sur la **figure 6A**, nous pouvons constater que seule la protéine de fusion Gal4-VP16 est capable d'activer la transcription du plasmide rapporteur contenant l'élément de réponse à Gal4 couplé à la luciférase ((Gal4)₅-TK-Luc) dans les cellules HeLa.

Pour tester un rôle possible de Tau dans la transcription, nous avons transfecté des quantités croissantes de plasmides codant pour les protéines Gal4 ou Gal4-Tau. Les résultats obtenus ne montrent pas de variations significatives de l'activité luciférase entre les différentes conditions testées (**Figure 6B**). Ainsi, la protéine Tau ne semble pas intervenir, du moins de façon directe, dans la transcription des gènes.

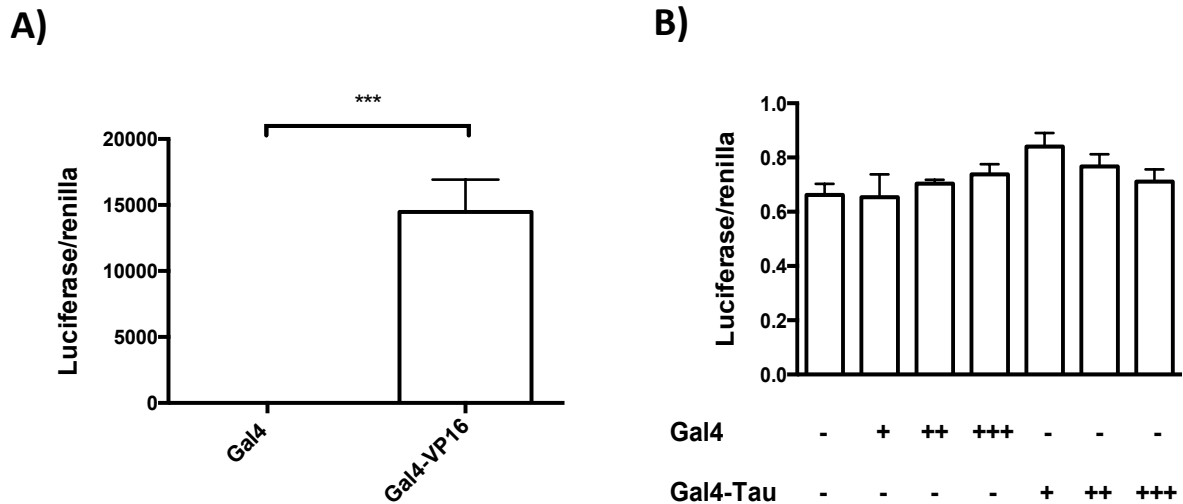


Figure 6 : Étude de l'implication de Tau dans la transcription. A) La protéine de fusion Gal4-VP16 active la transcription du gène rapporteur (Gal4)5-TK-Luc dans les cellules HeLa. L'activité luciférase normalisée par rapport à la *Renilla* est mesurée après 24h. (N=3 expériences indépendantes réalisées en triplicate) **B)** Les cellules HeLa ont été transfectées avec différentes quantités de plasmides Gal4 ou Gal4-Tau (+ : 25 ng, ++ : 50 ng, +++ : 100 ng) avec le gène rapporteur (Gal4)5-TK-Luc. L'activité luciférase est mesurée et représentée comme décrits en A).

La protéine Tau pourrait agir de manière indirecte sur la transcription génique. En effet, la protéine Tau en interagissant avec DDX5 pourrait «séquestrer » cette dernière et ainsi interférer avec l'activité transcriptionnelle de différents facteurs de transcription dont l'activité des dépendante de DDX5. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le facteur p53 qui est co-régulé par DDX5 et pour son rôle connu dans la réparation de l'ADN, un mécanisme altéré dans la maladie d'Alzheimer (Bates *et al.*, 2005; Obulesu and Rao, 2010). Nous avons transfecté les cellules HeLa avec un plasmide rapporteur contenant l'élément de réponse à p53 (p53)₁₃-TATA-Luc et les plasmides codant pour la protéine Tau et/ou pour p53. Les résultats montrent, comme attendu, que la surexpression du facteur de transcription p53 entraîne une

augmentation de l'activité transcriptionnelle du plasmide (p53)₁₃-TATA-Luc (6 fois plus après quantification). Cependant, aucun effet n'est observé en présence de la protéine Tau (**Figure 7**). La surexpression de la protéine Tau n'entraîne donc pas de modification de l'activité transcriptionnelle de p53.

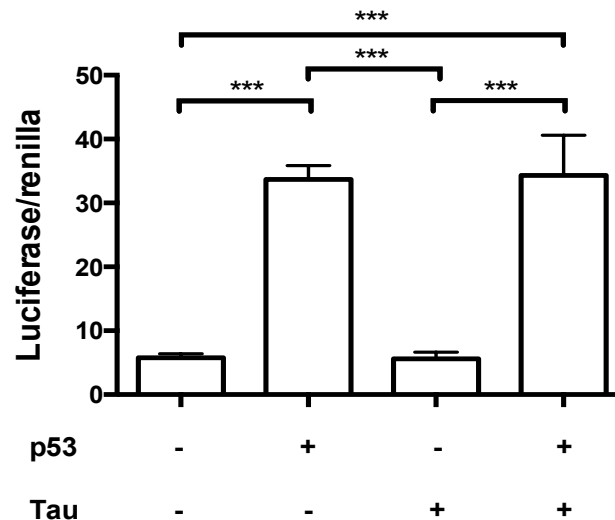


Figure 7 : Étude de l'implication indirecte de Tau dans la transcription. Transfection des cellules HeLa avec le plasmide rapporteur contenant l'élément de réponse à p53 (p53)₁₃-TATA-Luc en présence du plasmide codant pour p53 et/ou du plasmide codant pour Tau. L'activité luciférase est mesurée et représentée comme décrits dans la figure 6.

Ainsi, l'ensemble des résultats indique que la protéine Tau n'est pas impliquée dans les mécanismes de régulation de la transcription que ce soit de façon directe ou indirecte.

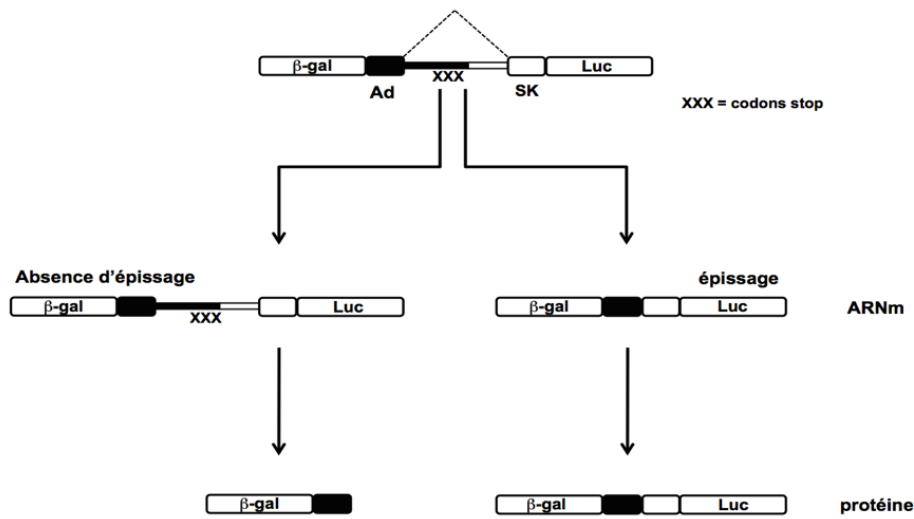
2. La protéine Tau régule négativement l'épissage des ARN

Nous avons ensuite testé l'implication de la protéine Tau dans l'épissage. Pour cela, nous avons transfecté les lignées HeLa et HEK-293T avec le plasmide pTN24 en présence ou non du plasmide codant pour la protéine Tau. Le plasmide pTN24 est composé des gènes rapporteurs β -galactosidase et luciférase encadrant un intron sur lequel a été inséré des sites d'épissage issus de fragments de gènes de l'adénovirus et du gène de la tropomyosine (**Figure 8A**). Lorsque l'intron est épissé, on obtient alors une protéine de fusion β -galactosidase / luciférase. Lorsque l'intron n'est pas épissé,

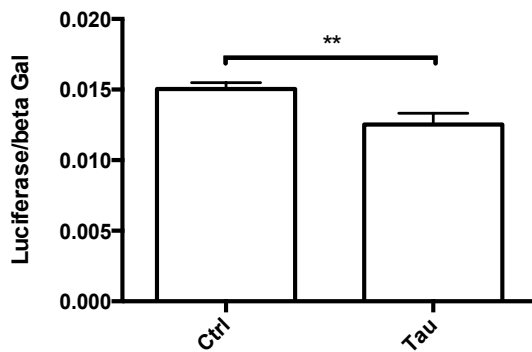
la traduction de l'ARN est interrompue en raison de la présence des codons stop sur ce dernier entraînant alors la perte du signal de la luciférase.

Les résultats obtenus montrent une diminution significative du ratio luciférase / β -galactosidase dans les cellules HEK-293T (**Figure 8B**) et dans les cellules HeLa (**Figure 8C**) après 48 h de transfection lorsque la protéine Tau est surexprimée. Cette baisse du ratio (de 20% et 40% respectivement en comparaison aux cellules contrôles) reflète une diminution des ARN épissés par rapport aux ARN non épissés en présence de Tau (Tau) comparé aux cellules contrôles (Ctrl).

A)



B)



C)

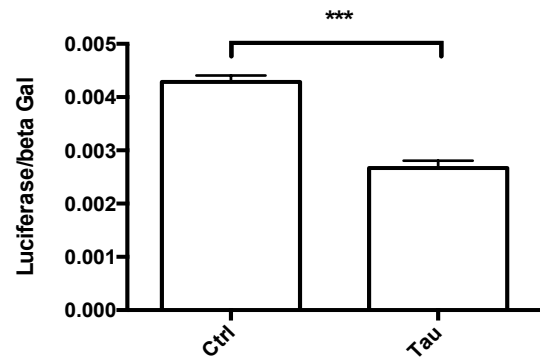


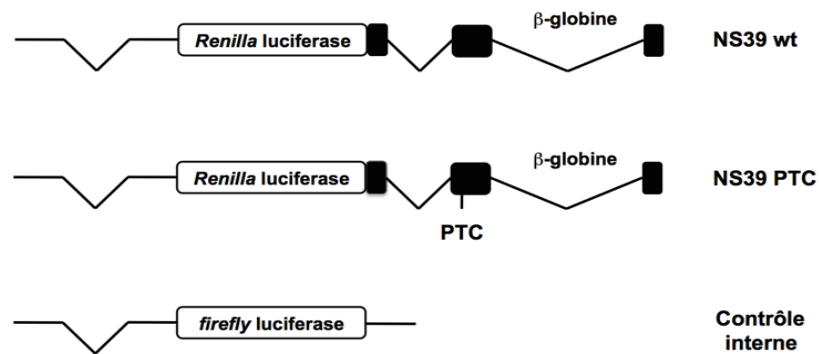
Figure 8 : Tau régule négativement l'épissage. **A).** Représentation schématique du fonctionnement du plasmide pTN24 utilisé pour étudier l'épissage. Le plasmide est composé d'un intron contenant des codons stop (XXX). Cet intron est encadré par des sites d'épissage (Ad pour le fragment du gène de l'adénovirus et SK pour la tropomyosine), ainsi que par des gènes rapporteurs : la β -galactosidase (β -gal) et la luciférase (Luc). L'épissage du transcrit aboutit à une protéine de fusion β -galactosidase / luciférase dont les deux signaux sont ensuite détectés au luminomètre. Tandis que l'absence d'épissage entraîne l'arrêt de la traduction et ainsi, seul le signal de la β -galactosidase sera détecté (Adapté d'après (Nasim and Eperon, 2006)). **B).** Transfection du plasmide pTN24 en absence (Ctrl) ou en présence du plasmide codant pour Tau (Tau) dans la lignée HEK-293T. (N=3 expériences indépendantes réalisées en triplicate) **C).** Transfection du plasmide pTN24 en absence (Ctrl) ou en présence du plasmide codant pour Tau (Tau) dans la lignée HeLa. (N=3 expériences indépendantes réalisées en triplicate).

3. La protéine Tau régule positivement la dégradation des ARN par la voie NMD

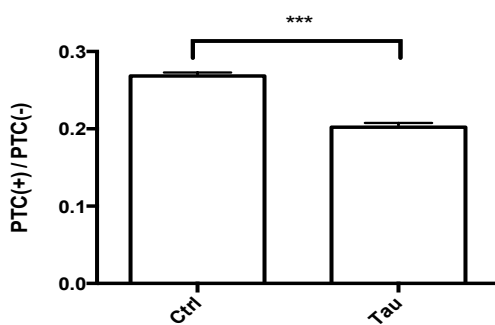
Le rôle potentiel de la protéine Tau dans la voie NMD a été testé par la transfection d'un plasmide rapporteur pCI-neo (SV40-*Renilla* luciférase) avec le plasmide codant pour Tau et un contrôle interne (*Firefly* luciférase) dans les lignées cellulaires HeLa, HEK-293T et SH-SY5Y pendant 48 h. Le plasmide pCI-neo est constitué du gène de la *Renilla* luciférase fusionné au gène de la β -globine humain sauvage (NS39 wt) ou contenant une mutation non-sens au niveau du codon 39 (NS39 PTC) (**Figure 9A**). Ainsi, l'ARN transcrit provenant du plasmide NS39 PTC possède un codon de terminaison prématuré (PTC) entraînant la reconnaissance et la dégradation de l'ARNm par la machinerie du système NMD.

Les résultats montrent une baisse significative du ratio NS39 PTC / NS39 wt (PTC (+) / PTC (-)) dans les cellules HEK-293T (**Figure 9B**), les cellules SH-SY5Y (**Figure 9C**) et les cellules HeLa (**Figure 9D**) lorsque la protéine Tau est surexprimée. Cette diminution du ratio PTC (+) / PTC (-) (baisse de 27%, 46% et 91% respectivement par rapport aux cellules contrôles) traduit une augmentation du nombre d'ARN dégradé par la voie NMD, dans les trois types cellulaires testés, en présence de la protéine Tau.

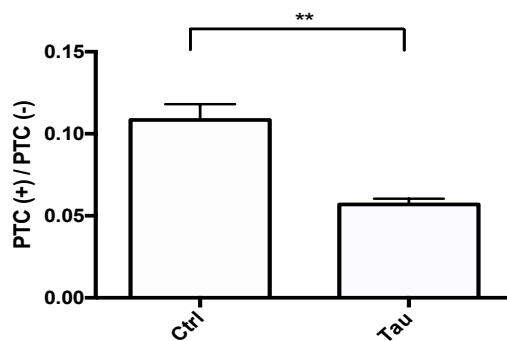
A)



B)



C)



D)

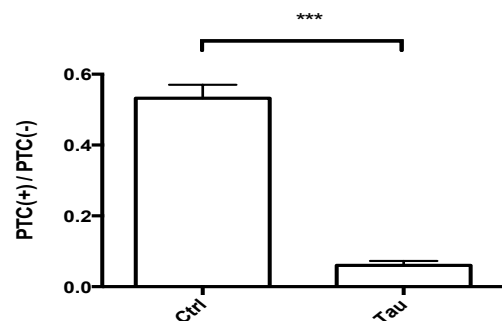


Figure 9 : Tau régule positivement la voie NMD. A). Représentation schématique du plasmide pCI-neo utilisé pour étudier la dégradation des ARN par le système NMD. Le plasmide transfecté est composé d'un gène rapporteur (*Renilla* luciférase) fusionné au gène de la β -globine wild-type (NS39 wt), ou contenant une mutation non-sens au niveau du codon 39 (NS39 PTC) entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré (PTC) dans le transcrit et ainsi la dégradation de l'ARN par la voie NMD. Le plasmide *Firefly* luciférase est utilisé comme contrôle interne (Adapté d'après (Boelz *et al.*, 2006)). **B).** Transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en absence (Ctrl) ou en présence (Tau) du plasmide codant pour Tau dans les cellules HEK-293T **C).** Transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en absence (Ctrl) ou en présence (Tau) du plasmide codant pour Tau dans les cellules SH-SY5Y **D).** Transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en absence (Ctrl) ou en présence (Tau) du plasmide codant pour Tau dans les cellules HeLa. (N=3 expériences indépendantes réalisées en triplicate).

3.1 Le rôle de Tau dans la régulation de la voie NMD est modulée par DDX5

Afin de déterminer si DDX5 est impliquée dans l'activité régulatrice de Tau sur le NMD, nous avons inhibé l'expression de DDX5 par siRNA puis transfecté le plasmide rapporteur pCI-neo (SV40-*Renilla* luciférase) avec le plasmide codant pour Tau et le contrôle interne (Firefly luciférase) (comme décrits dans la partie III.3. des résultats) dans la lignée cellulaire HeLa. Le western-blot met en évidence une baisse de 70% de l'expression de DDX5 dans les cellules transfectées avec le si-DDX5 après 72 h (**Figure 10A**). Comme montré précédemment, la surexpression de la protéine Tau en présence de siRNA contrôles (si-scramble) entraîne une baisse significative du ratio PTC (+) / PTC (-) reflétant une augmentation de l'activité NMD (diminution du ratio de 25% par rapport aux cellules contrôles) (**Figure 10B**). Cet effet est cependant aboli en présence du si-DDX5 démontrant que l'effet de Tau sur le NMD est dépendant de l'expression de DDX5.

Les résultats obtenus précédemment montrent une interaction entre Tau et DDX5 mais également la présence de l'ARN hélicase DDX17 dans le complexe. Dans ce contexte, nous avons testé si DDX17 peut jouer un rôle dans l'activité régulatrice de Tau sur le NMD à l'image des résultats obtenus pour DDX5. Pour cela, nous avons réitérer l'expérience précédente en présence de siRNA dirigés contre DDX17 ou de siRNA contrôles (si-scramble). Le western-blot révèle une baisse de l'expression de DDX17 de 45% en présence du si-DDX17 en comparaison aux cellules contrôles (si-scramble) après 72 h (**Figure 10C**). L'analyse des transfections révèle qu'en condition contrôle (si-scramble), la surexpression de Tau entraîne une baisse significative de 36% du ratio PTC (+) / PTC (-) démontrant une augmentation de l'activité NMD. Cependant, on constate que cet effet persiste en présence du si-DDX17 montrant que l'effet de Tau sur le NMD n'est pas dépendant de l'expression de DDX17 (**Figure 10D**).

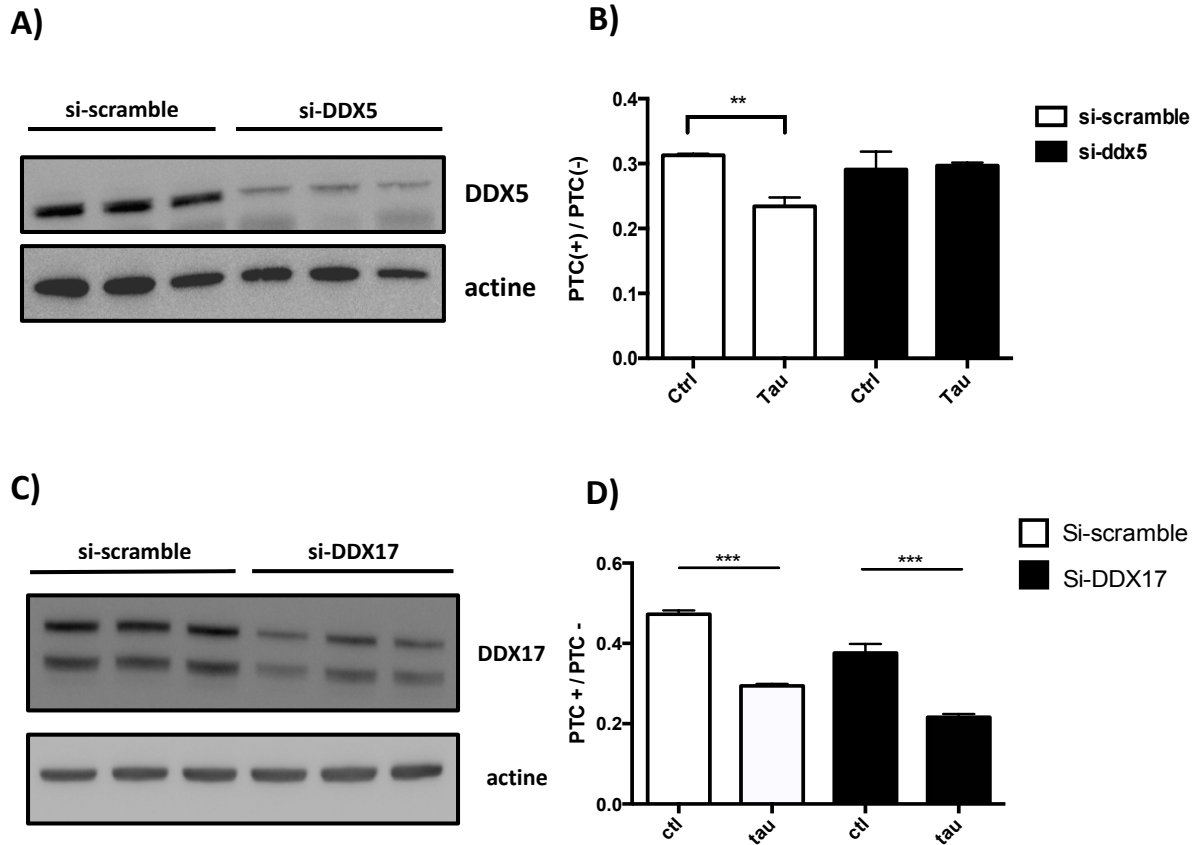


Figure 10 : La régulation du NMD par la protéine Tau dépend de l'expression de DDX5. **A).** Western-blot effectué à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti-actine révélant une diminution de la protéine DDX5 en présence de si-DDX5 comparé au si-scramble dans les cellules HeLa après 72 h. **B).** Transfection du si-scramble (barres blanches) ou du si-DDX5 (barres noires) dans les cellules HeLa, suivi 24 h après de la transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en absence (Ctrl) ou en présence (Tau) du plasmide codant pour la protéine Tau pendant 48 h. (N=4 expériences indépendantes réalisées en triplicate). **C).** Western-blot réalisé à l'aide des anticorps anti-DDX17 et anti-actine révélant une baisse de DDX17 en présence du si-DDX17 comparé au si-scramble dans les cellules HeLa après 72 h **D).** Transfection du si-scramble (barres blanches) ou du si-DDX17 (barres noires) dans les cellules HeLa, suivi 24 h après de la transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en absence (ctl) ou en présence (Tau) du plasmide codant pour Tau pendant 48 h. (N=3 expériences indépendantes réalisées en triplicate).

3.2 L'activité de Tau sur la voie NMD est régulée par SRA

Nous avons démontré précédemment que l'ARN long non codant SRA module l'interaction entre Tau et DDX5 suggérant que cet ARN puisse également réguler l'effet de Tau sur le NMD (voir partie I.3 des résultats). Afin de tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord inhibé l'expression de SRA par siRNA suivi 24 h après par la transfection des plasmides NS39 wt ou NS39 PTC en présence (Tau) ou non (Ctl) du

plasmide codant pour Tau. L'effet du siRNA dirigé contre SRA a été vérifié par qPCR en temps réel après 72 h de transfection. On constate une baisse de l'expression de SRA de 90% en présence du si-SRA par rapport aux cellules contrôles (si-scramble) (**Figure 11A**). Concernant les transfusions, les résultats montrent que la surexpression de Tau en condition contrôles (si-scramble) entraîne une baisse de 33% du ratio PTC (+) / PTC (-) démontrant une augmentation du NMD. En présence du si-SRA, cet effet de Tau sur la voie NMD est cependant inhibé. Ces résultats démontrent que ce mécanisme dépend également de l'expression de l'ARN long non codant SRA (**Figure 11B**).

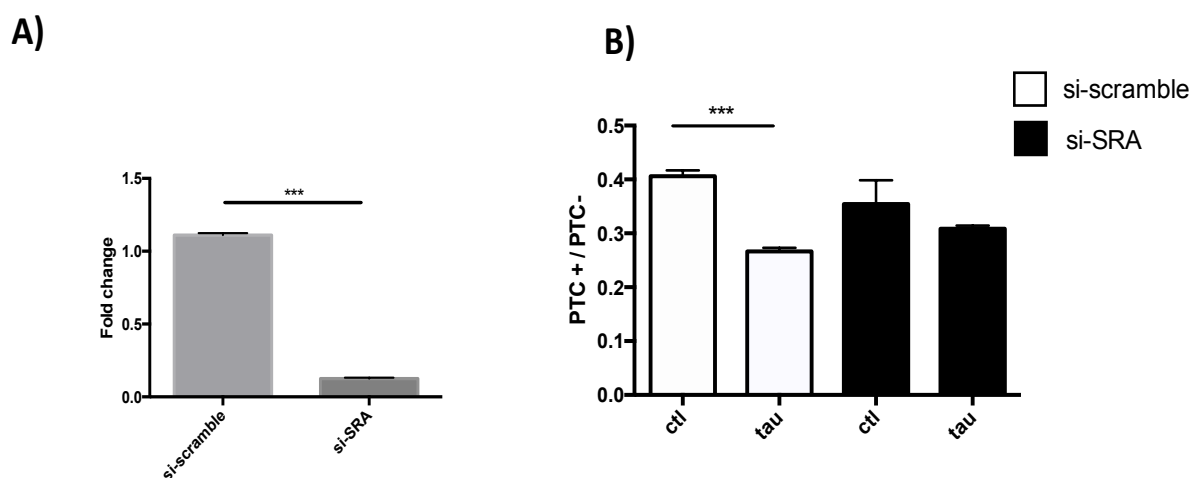


Figure 11 : La régulation de Tau sur le NMD dépend de l'ARN long non codant SRA. A). Analyse de l'expression de SRA par qPCR après transfection de siRNA dirigés contre SRA (si-SRA) ou siRNA contrôles (si-scramble) dans les cellules HeLa après 72 h. **B).** Transfection du si-scramble (barres blanches) ou du si-SRA (barres noires) dans les cellules HeLa suivi, 24 h après, par la transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en présence (Tau) ou en absence (CTL) du plasmide codant pour Tau pendant 48 h. (N=3 expériences indépendantes effectuées en triplicate).

3.3 Tau interagit avec CBP80, une protéine régulatrice du NMD

Afin de mieux comprendre l'implication de Tau dans la régulation du NMD, nous avons testé la capacité de Tau à interagir avec différentes protéines régulatrices de ce mécanisme. Pour cela, nous avons utilisé la lignée cellulaire stable SY5Y ou SY5Y-Tau afin de réaliser un streptavidine-pulldown (lignées et technique décrites dans la partie I.1 des résultats).

Les protéines Ufp1, Upf3B et CBP80 ont été testées pour leur rôle dans l'activation du NMD et leur capacité à interagir avec DDX5 (Geißler *et al.*, 2013). Les résultats obtenus montrent que Tau co-précipite uniquement avec le facteur CBP80 démontrant une interaction entre les deux protéines (**Figure 12**).

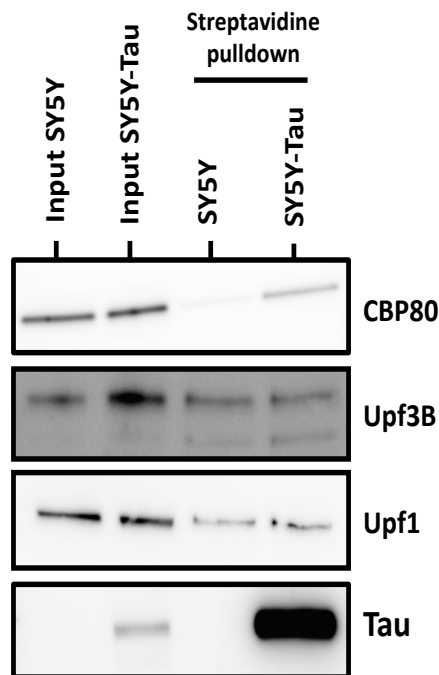


Figure 12 : Tau interagit avec CBP80. Résultat représentatif du streptavidine-pulldown effectué à partir d'extraits cellulaires sur-exprimant (SY5Y Tau) ou non (SY5Y) Tau fusionnée au tag streptavidine et révélé par western-blot à l'aide des anticorps anti-CBP80, anti-Upf3B, anti-Upf1 et anti-Tau Cter. (N=3 expériences indépendantes)

IV. Étude du complexe Tau-DDX5 dans les tauopathies

1. La mutation P301S renforce la régulation positive de Tau sur le NMD

Les mutations P301S et P301L de Tau sont associées au développement des démences fronto-temporales avec syndrome parkinsonien liées au chromosome 17 (FTDP-17). Nous avons testé l'effet de ces mutations dans la régulation de Tau sur la voie NMD. Pour cela, nous avons transfecté les cellules HeLa pendant 48 h avec les plasmides rapporteurs du NMD en présence ou non (ctl) des protéines Tau Wild-type (tau WT), Tau P301S (P301S) ou Tau P301L (P301L).

L'analyse par western-blot montre que Tau est exprimée en quantité équivalente entre les différentes conditions testées (**Figure 14A**). Les résultats des transfections mettent en évidence une baisse significative de 30% du ratio PTC (+) / PTC (-) lorsque la protéine Tau WT est surexprimée, traduisant une augmentation de l'activité NMD. On constate que le mutant P301S renforce cet effet de Tau dans la régulation du NMD avec une baisse du ratio PTC (+) / PTC (-) de 58% comparativement aux cellules contrôles. La surexpression du mutant P301L induit le même effet que la Tau non mutée sur le système NMD (**Figure 13B**).

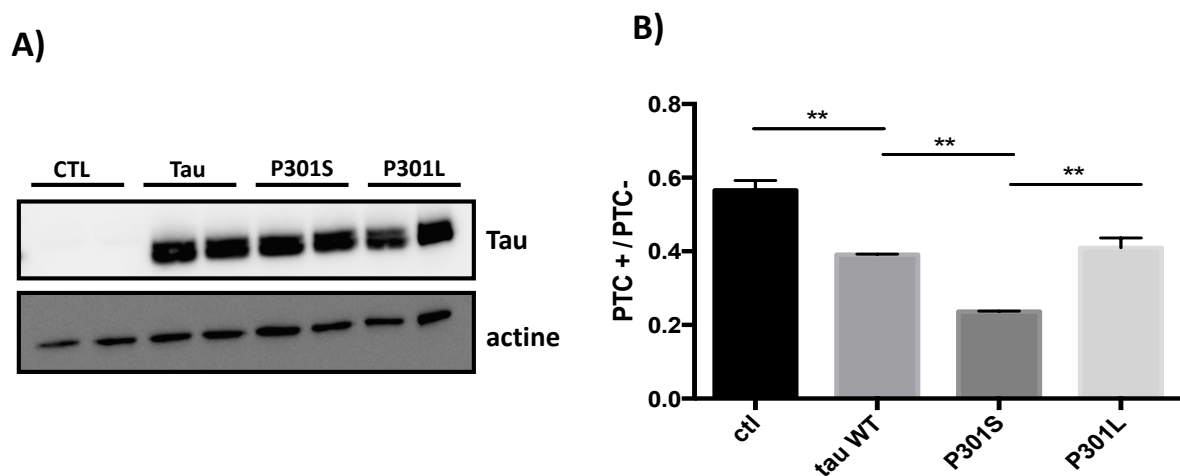


Figure 13 : La mutation P301S renforce l'effet de Tau sur le NMD. A). Analyse de l'expression de Tau par western blot effectué sur les cellules HeLa après 48 h de transfection avec les plasmides codant pour la Tau wild-type (Tau) ou les mutants Tau (P301S, P301L) et révélé avec l'anticorps anti Tau-Cter. **B).** Transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en absence (ctl) ou en présence du plasmide codant pour Tau wild-type (Tau WT) ou mutée (P301S, P301L) dans les cellules HeLa. (N=4 expériences indépendantes réalisées en triplicate).

L'ensemble de ces résultats démontre des effets distincts entre les mutants P301S et P301L sur la voie NMD. En effet, la mutation P301S renforce la régulation de Tau sur le NMD (activation environ 2 fois plus forte par rapport à la Tau wild-type) tandis que la mutation P301L ne semble pas avoir d'effet.

2. P301S et P301L ne modifient pas l'interaction entre Tau et DDX5 *in vitro*

Les résultats décrits précédemment mettent en évidence que la mutation P301S module l'activité de Tau. En effet, cette dernière renforce la régulation positive de Tau sur le NMD. Suite à ces résultats, nous avons supposé que la mutation P301S puisse moduler l'interaction entre Tau et DDX5. Pour tester cela, nous avons effectué un GST-pulldown à partir de DDX5 synthétisée *in vitro* et des protéines de fusion GST-Tau, GST-P301S et GST-P301L produites dans les bactéries *e. coli*. Les résultats obtenus montrent que l'interaction entre Tau et DDX5 n'est pas modifiée en présence des mutations P301S et P301L comparativement à la Tau non mutée (**Figure 14**).

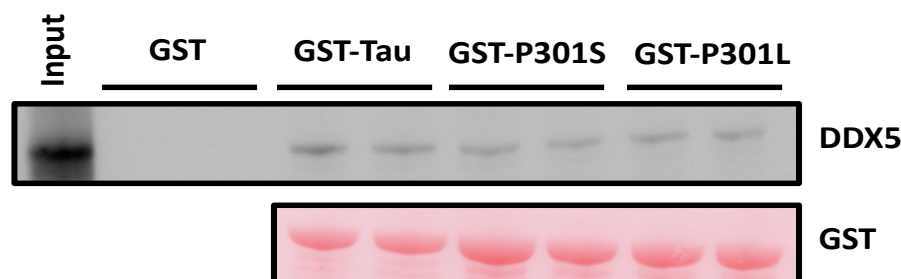


Figure 14 : Les mutations P301S et P301L ne modifient pas l'interaction entre Tau et DDX5. Résultat représentatif du GST-pulldown obtenu entre la protéine DDX5 synthétisée *in vitro* et la protéine de fusion GST-Tau ou la protéine Tau mutée (GST-P301S et GST-P301L) et révélé par western-blot à l'aide de l'anticorps anti-DDX5. Les bandes rouges représentent les protéines GST après transfert sur la membrane de nitrocellulose et révélées par coloration au rouge ponceau. (N=3 expériences indépendantes)

3. La mutation P301S modifie le niveau de phosphorylation de Tau au niveau des thréonines 231 et 235

L'approche par GST-pulldown ne permet pas d'étudier l'impact du niveau de phosphorylation de Tau sur son interaction avec DDX5. Or, le niveau de phosphorylation de Tau est connu pour moduler son interaction avec ses partenaires (Drewes *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1999). De plus, des études réalisées dans des modèles transgéniques murins ont mis en évidence que les mutations P301S et P301L modulent le niveau de phosphorylation de Tau, notamment au niveau de son domaine riche en proline (Götz *et al.*, 2001, 2010; Delobel *et al.*, 2008).

Il n'existe pas d'études visant à déterminer l'impact des mutations P301S et P301L sur l'état de phosphorylation de Tau en lignée cellulaire. Ainsi, nous avons étudié l'état de phosphorylation de Tau après 48 h de transfection par des plasmides codant pour la Tau WT, P301S ou P301L dans les cellules HeLa. Nous avons effectué une approche par immunofluorescence à l'aide des anticorps anti Tau-Cter et anti-AT180 reconnaissant respectivement la protéine Tau indépendamment de son état de phosphorylation et Tau phosphorylée au niveau de la thréonine 231 et sérine 235 (**Figure 15A**).

L'analyse des résultats montre un nombre de cellules phosphorylées comparable entre les conditions (entre 40 et 45% des cellules sont phosphorylées) (**Figure 15B**). Cependant, la quantification du niveau de fluorescence montre une augmentation de la phosphorylation des protéines Tau, au niveau de la thréonine 231 et sérine 235, lorsque les protéines Tau P301S sont surexprimées par rapport aux cellules contrôles (Tau WT) (augmentation de 75% de l'intensité de fluorescence). De façon intéressante, les protéines Tau P301S sont également plus fortement phosphorylées que les protéines Tau P301L (augmentation de 50% du niveau de fluorescence) (**Figure 15C**).

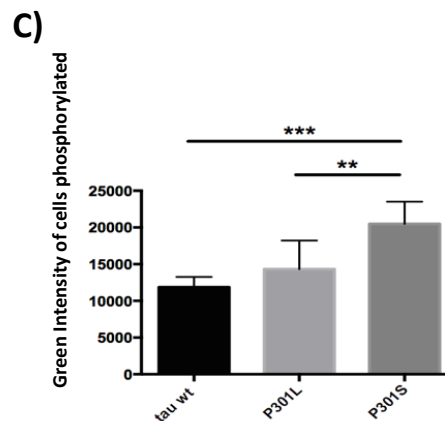
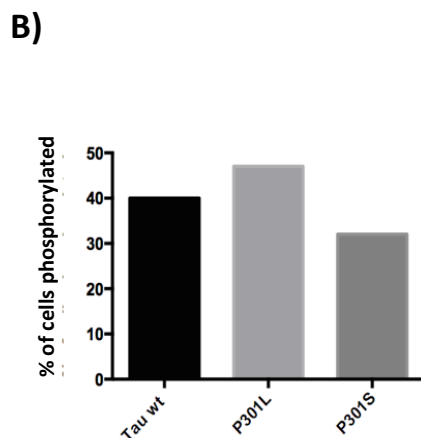
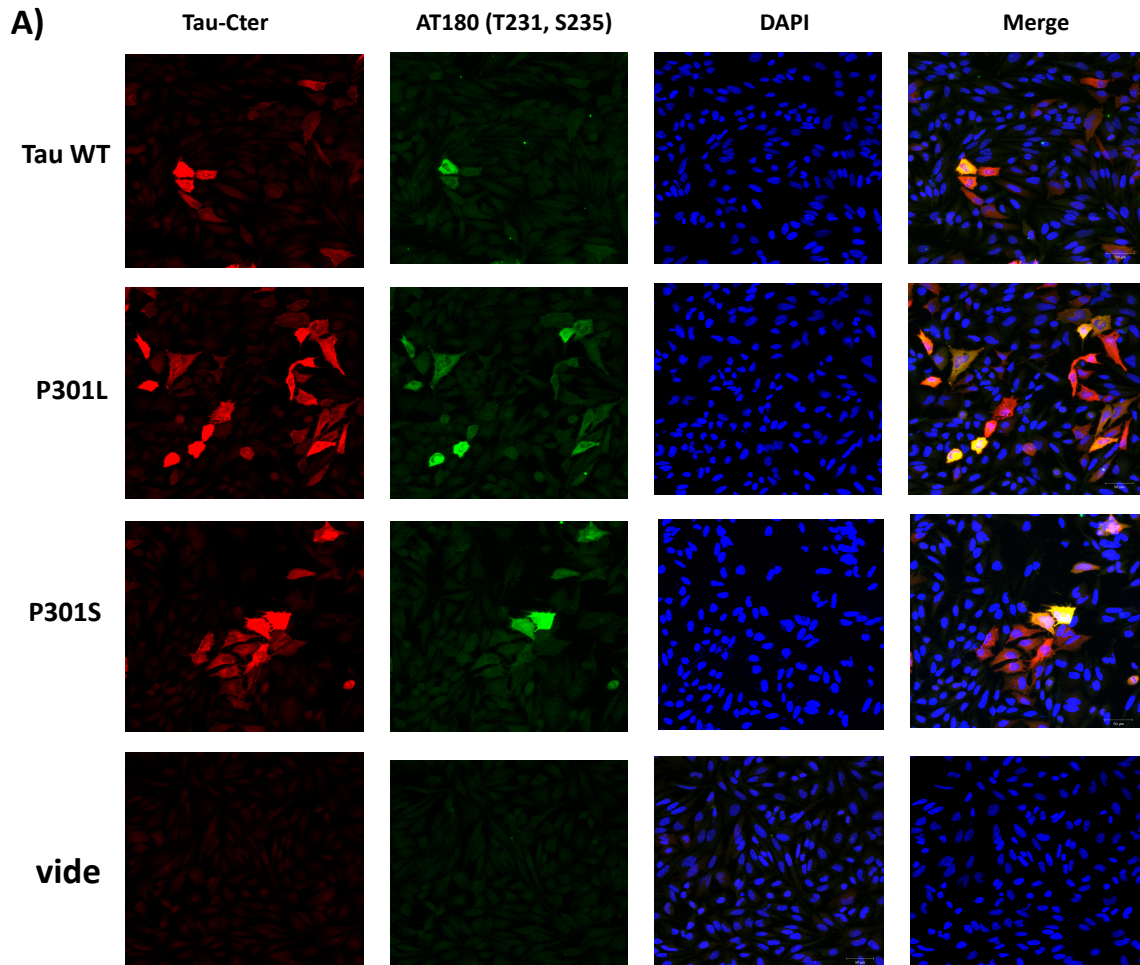


Figure 15 : La mutation P301S augmente le niveau de phosphorylation de Tau au niveau de son domaine riche en proline. A). Les cellules HeLa surexprimant la protéine Tau wild-type (Tau WT) ou les protéines Tau mutées (P301L, P301S) ou un plasmide vide (vide) ont été soumises à une immunofluorescence à l'aide des anticorps anti Tau-Cter et anti-AT180. **B).** Pourcentage de cellules phosphorylées (cellules AT180 positives parmi les cellules transfectées (Tau-Cter positives)) par conditions. **C).** Mesure de l'intensité de fluorescence des cellules phosphorylées (AT180 positives) par conditions.

La même expérience a été effectuée à l'aide de AT8, un anticorps qui révèle la protéine Tau phosphorylée au niveau des résidus sérine 202 et thréonine 205 (**Figure 16**). La quantification du niveau de fluorescence ne montre pas de cellules phosphorylées (AT8 positives) au niveau de cet épitope après 48 h de transfection.

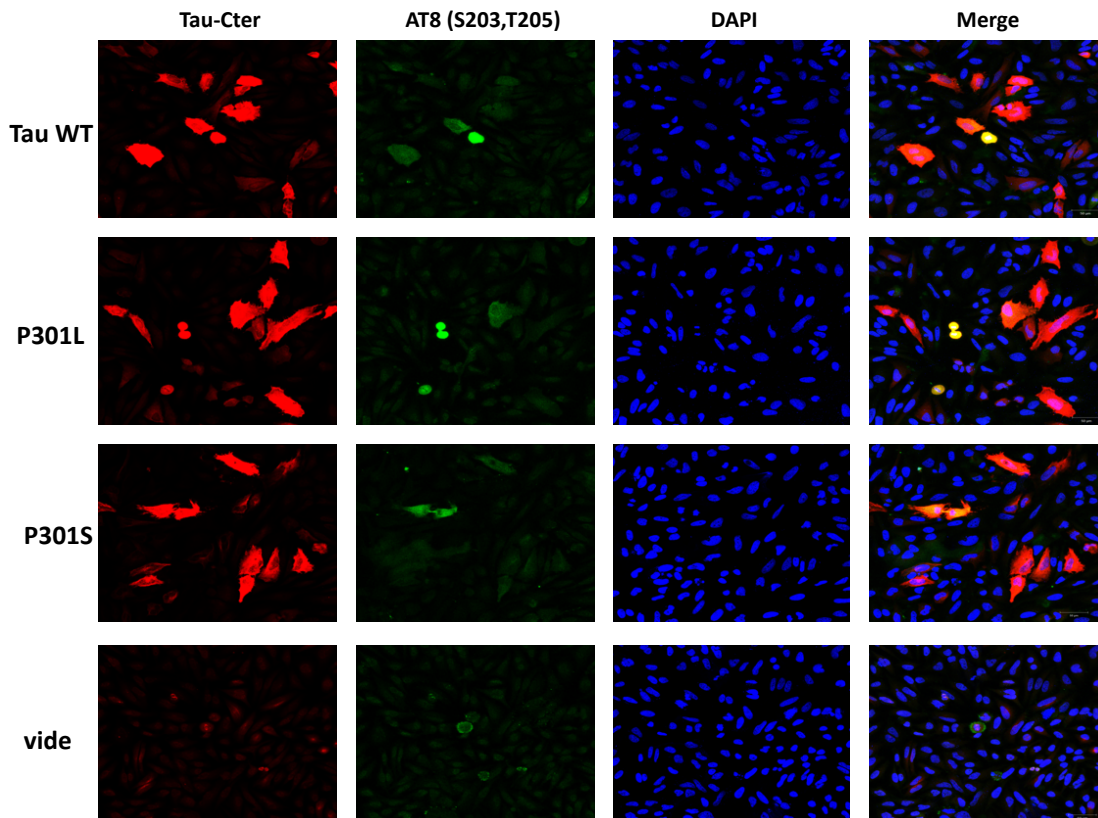


Figure 16 : Les mutants P301S et P301L ne modulent pas le niveau de phosphorylation de Tau au niveau des résidus sérine 202 et thréonine 205. A). Les cellules HeLa surexprimant la protéine Tau wild-type (Tau WT) ou les protéines Tau mutées (P301L, P301S) ou un plasmide vide (vide) ont été soumises à une immunofluorescence à l'aide des anticorps anti Tau-Cter et anti-AT8. Les deux cellules AT8 positives, observées dans les conditions P301S et P301L, sont des cellules en mitose. Une augmentation de la phosphorylation de Tau est connue pour se produire lors de la division cellulaire (Pope et al., 1994).

L'ensemble de ces résultats montre que la mutation P301S augmente le niveau de phosphorylation de Tau par rapport à la Tau wild-type et à la mutation P301L. Cet effet est identifié au niveau des résidus Thr231 et Ser235, des sites localisés dans le domaine d'interaction de Tau avec DDX5.

4. La phosphorylation générale de Tau ne module pas son interaction avec DDX5 *in vitro*

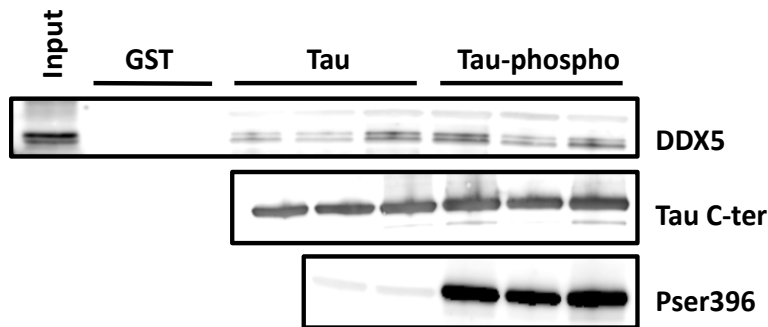
Les résultats décrits précédemment suggèrent que le niveau de phosphorylation de Tau pourrait moduler son interaction avec DDX5 et, in fine, son effet dans la régulation de la voie NMD. En effet, nos résultats révèlent que le mutant P301S renforce l'effet de Tau sur le NMD et nos analyses par immunofluorescence montrent que cette mutation augmente le niveau de phosphorylation de Tau.

Nous avons étudié l'impact d'une augmentation globale du niveau de phosphorylation de Tau dans son interaction avec DDX5. Pour générer de la Tau hyperphosphorylée, nous avons procédé à une incubation de la protéine de fusion GST-Tau avec un lysat de cortex de rat en présence d'ATP. Puis, nous avons effectué un GST-pulldown à partir de la protéine DDX5 synthétisée *in vitro* dans un lysat de réticulocyte et de GST-Tau phosphorylée (Tau-phospho) ou non (Tau) *in vitro* (**Figure 17A**).

L'augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine de fusion GST-Tau a été validée par western-blot à l'aide de l'anticorps anti-Pser396 qui reconnaît la protéine Tau phosphorylée au niveau de la sérine 396. Il est important de préciser que cet anticorps est utilisé ici comme marqueur de la phosphorylation de Tau car cette technique permet de phosphoryler plusieurs résidus. Concernant les résultats du GST-pulldown, on ne constate pas de différence d'interaction entre Tau et DDX5 pour les différentes conditions testées. Ces résultats ont été validés suite à la mesure des quantités relatives des protéines DDX5 et GST-Tau (**Figure 17B**).

Pour conclure, nos résultats révèlent qu'une augmentation globale du niveau de phosphorylation de Tau ne module pas son interaction avec DDX5 *in vitro*.

A)



B)

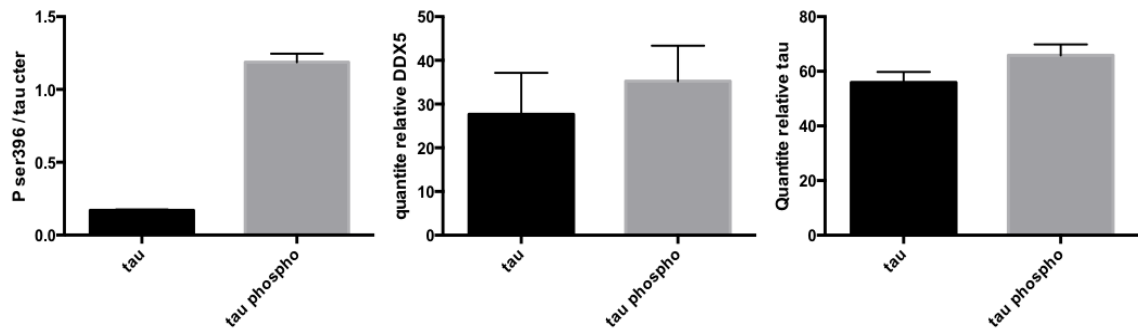


Figure 17 : Le niveau de phosphorylation de Tau ne module pas son interaction avec DDX5 *in vitro*. A). Résultat représentatif du GST-pulldown effectué à partir de DDX5 produite *in vitro* et la protéine recombinante GST-Tau non phosphorylée (Tau) ou phosphorylée (Tau-phospho) et révélé par western blot à l'aide des anticorps anti-DDX5, anti Tau-Cter et anti-Pser396. B). L'expression des protéines a été quantifiée par le logiciel ImageJ. Le niveau de phosphorylation des protéines Tau (Pser396) a été quantifié et normalisé par rapport à la quantité de protéines Tau totales (Tau C-ter). (N=3 expériences indépendantes)

5. La phosphorylation de Tau sur la thréonine 231 régule son effet sur la voie NMD

Nous avons démontré précédemment que la mutation P301S augmente le niveau de phosphorylation de Tau au niveau des résidus thréonine 231 et sérine 235. La thréonine 231 est particulièrement étudiée dans la littérature. La phosphorylation de cette dernière est connue pour moduler les différentes fonctions de Tau (Lu *et al.*, 1999; Cho and Johnson, 2004; Reynolds *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2015; Sottejeau *et al.*,

2015). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de ce résidu dans la régulation de Tau sur la voie NMD.

Nous avons généré des mutants phosphomimétiques et non phosphomimétiques de Tau au niveau de la thréonine 231. Le mutant non phosphomimétique (T231A) a été créé par la substitution de la thréonine en alanine, un acide aminé non chargé, tandis que le mutant phosphomimétique (T231E) a été généré par la substitution de la thréonine en acide glutamique, un acide aminé chargé négativement mimant de ce fait l'état de phosphorylation au niveau de ce site. Nous avons ensuite transfecté les cellules heLa pendant 48 h avec les plasmides codant pour la Tau WT ou les différents mutants T231A ou T231E. Comme attendu, la Tau WT induit une baisse significative de 32% du ratio PTC (+) / PTC (-), par rapport aux cellules contrôles (ctl), reflétant une augmentation de l'activité NMD. On peut voir que le mutant T231A abolit l'effet de Tau sur le NMD. Concernant le mutant T231E, celui-ci active la voie NMD de manière significative avec une baisse de 38% du ratio PTC (+) / PTC (-) par rapport aux cellules contrôles (ctl) (**Figure 18**).

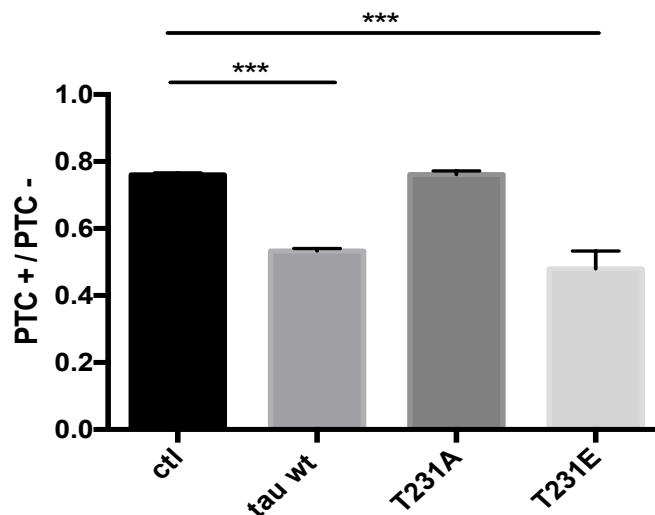


Figure 18 : La phosphorylation de la thréonine 231 module l'effet de Tau dans la régulation du NMD. Transfection du plasmide NS39 wt ou NS39 PTC en absence (ctl) ou en présence du plasmide codant pour la Tau wild-type (Tau WT) ou la Tau mutée (T231A, T231E) dans les cellules HeLa. (N=3 expériences indépendantes réalisées en triplicate).

Ces résultats révèlent que le niveau de phosphorylation de Tau au niveau de la thréonine 231 module sa fonction régulatrice dans la voie NMD.

6. Recherche de gènes cibles régulés par Tau

Nous avons également recherché de potentiels gènes cibles dont l'expression pourrait être régulée par Tau ou les mutants P301S et P301L suite à l'activation du NMD. Le NMD est un mécanisme qui empêche la synthèse de protéines tronquées en dégradant les ARNm qui contiennent un codon stop prématuré (PTC). Ce système est également connu pour dégrader 5 à 10% des ARNm « normaux » régulant ainsi l'expression de ces gènes (Schoenberg and Maquat, 2012). Parmi ces gènes, nous nous sommes intéressés à ceux impliqués dans des mécanismes connus pour être dérégulés au cours des tauopathies et/ou dont l'expression est altérée dans ces pathologies. Ainsi, l'expression des gènes GADD45, PSD95, PTBP1, PTBP2 et ATF3 a été testée par RT-qPCR après transfections des cellules HeLa pendant 48 h avec les plasmides codant pour la protéine Tau Wild-type (Tau WT) ou la Tau mutée P301S ou P301L.

L'expression de PSD95 et ATF3 ne semble pas être modulée suite à la surexpression des protéines Tau Wild-type ou pathologiques. Concernant l'étude de GADD45, les résultats montrent que l'expression de cette dernière a tendance à diminuer en présence de la Tau WT tandis que les mutants P301S et P301L ne semblent pas modifier son expression. Pour l'étude des facteurs PTB, on constate que la Tau WT entraîne une diminution non significative de l'expression de PTBP1 et PTBP2. Le mutant P301S diminue de façon significative l'expression de PTBP1 et PTBP2 (diminution de 20% et 40% respectivement) tandis que P301L ne semble pas avoir d'effet (**Figure 19**).

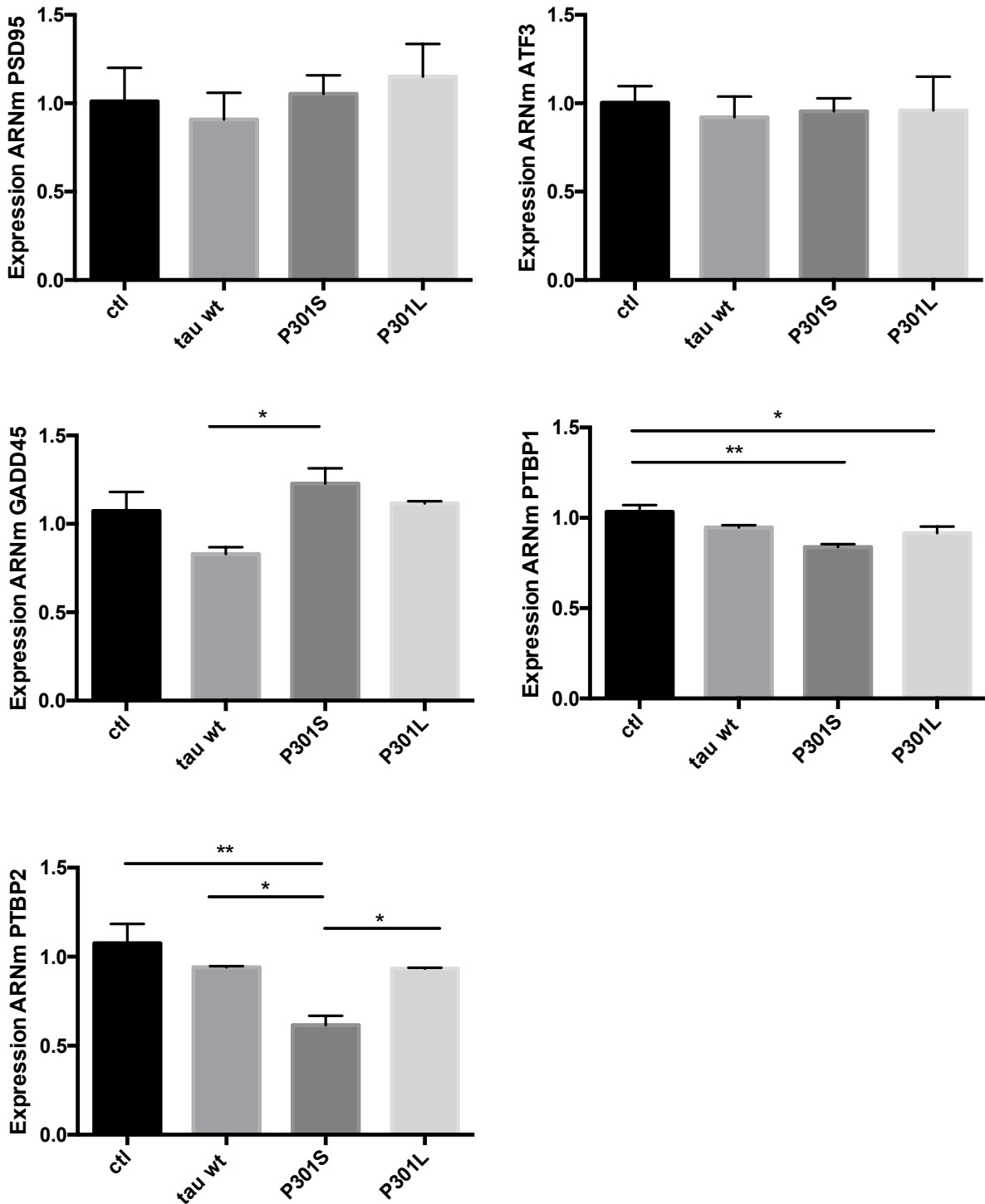


Figure 19 : Le mutant P301S de Tau régule négativement l'expression des facteurs d'épissage PTBP1 et PTBP2. Analyse de l'expression des gènes suivants : PSD95, ATF3, GADD45, PTBP1, PTBP2 par qPCR dans les cellules HeLa après 48 h de transfection des plasmides codant pour la Tau Wild-type (Tau wt) ou la Tau mutée (P301S, P301L). Les valeurs ont été normalisées par l'expression du gène de référence GUSB. (N=2 expériences indépendantes réalisées en triplicate).

Ainsi, seul le mutant P301S de Tau diminue significativement l'expression des facteurs d'épissage PTBP1 et PTBP2. Bien qu'il reste encore à déterminer que cet effet soit NMD dépendant, ces résultats renforcent l'idée que le mutant P301S joue un rôle particulier dans la régulation du NMD.

7. Accumulation de DDX5 dans le cytoplasme de neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer

Peu d'études ont été effectuées sur le rôle de DDX5 dans les tauopathies. Pour y remédier, nous avons étudié par immunofluorescence la localisation de DDX5 sur des coupes de cerveaux humains Alzheimer et contrôles à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti-AT8 reconnaissant la protéine Tau hyperphosphorylée. Les résultats mettent en évidence une accumulation de DDX5 au niveau du cytoplasme pour les coupes Alzheimer (AD) en comparaison aux coupes contrôles (C) ainsi qu'une co-localisation partielle entre DDX5 et la protéine Tau pathologique (Tau hyperphosphorylée) (**Figure 20**). Ces résultats permettent de suggérer une dérégulation de DDX5 dans cette pathologie.

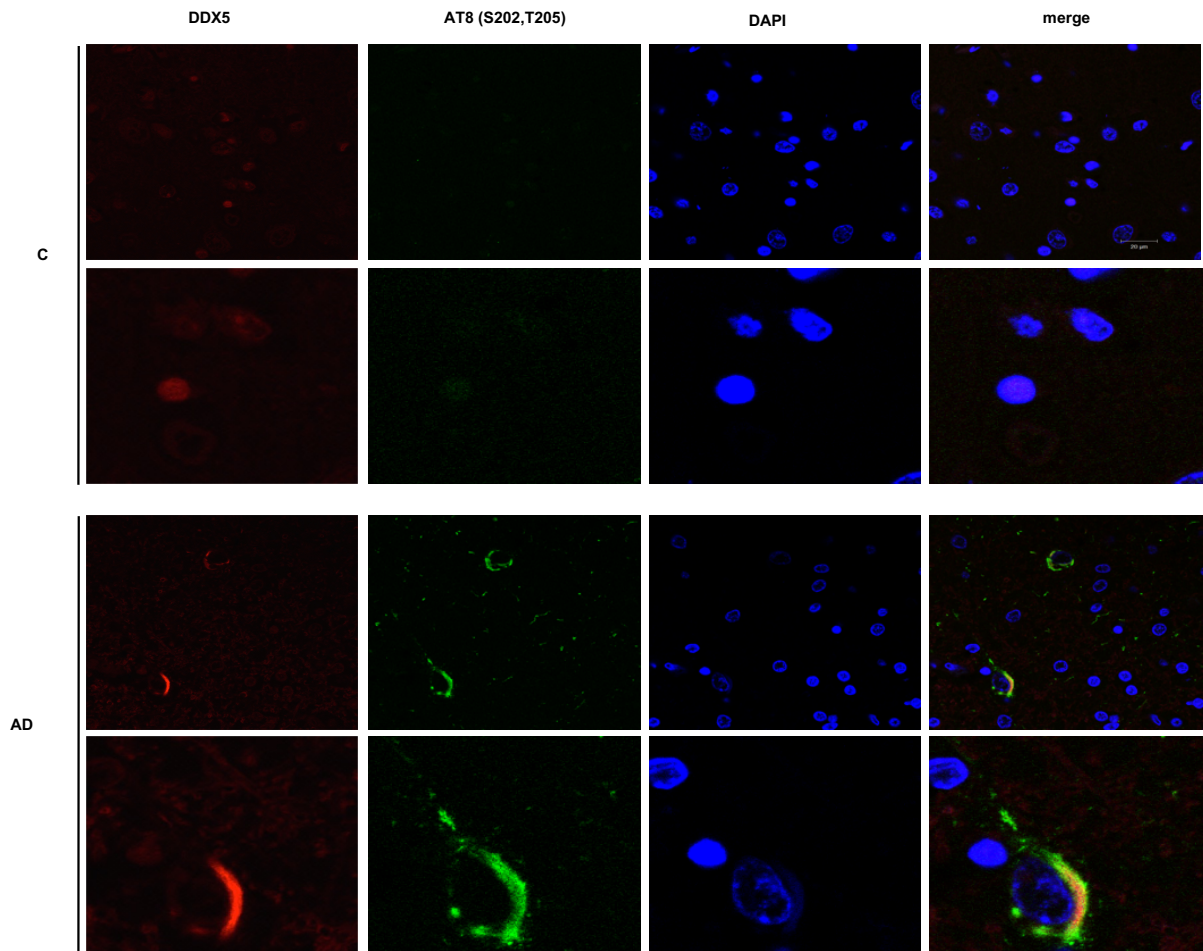


Figure 20 : Accumulation de DDX5 dans le cytoplasme des neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Des coupes de cerveaux provenant de sujets contrôles (C) ou de patients atteints d'Alzheimer (AD) ont été soumises à une immunofluorescence à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti-Tau hyperphosphorylée (AT8).

DISCUSSION

I. DDX5 et DDX17, des nouveaux partenaires des protéines Tau

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence une interaction entre les protéines Tau et DDX5 ainsi que la présence de DDX17 dans ce complexe. Les ARN hélicases DDX5 et DDX17 sont connues pour former des hétérodimères et être impliquées dans divers mécanismes biologiques et pathologiques. Ces deux protéines sont notamment surexprimées dans les cancers du sein, colorectal et de la prostate jouant un rôle actif dans le développement tumoral (Fuller-Pace and Moore, 2011). Le rôle de DDX5 et DDX17 au sein du système nerveux a été peu étudié. Toutefois, quelques travaux suggèrent l'implication de ces protéines dans le fonctionnement physiologique des neurones. En effet, DDX5 est capable de réguler l'épissage alternatif de transcrits exprimés au niveau du système nerveux central tels que MBP (*myelin basic protein*) et Tau (Kar *et al.*, 2011; Hoch-Kraft *et al.*, 2018). Plus récemment, des travaux ont mis en évidence une interaction entre l'hétérodimère DDX5/DDX17 et REST (*repressor element 1-silencing transcription factor*), un facteur répresseur de la transcription de gènes neuronaux qui est dérégulé chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lu *et al.*, 2014). Cette interaction favorise le recrutement de REST au niveau du promoteur de gènes cibles dont l'expression est régulée lors de la différenciation neuronale dans les cellules neuroblastome SH-SY5Y (Lambert *et al.*, 2018). De manière intéressante, au cours de ce projet, une autre équipe a mis en évidence la capacité des protéines Tau à interagir avec DDX5, TIA1 et d'autres protéines impliquées dans le métabolisme des ARN, de façon ARN dépendante (Vanderweyde *et al.*, 2017).

II. Les ARN, des acteurs clés dans la régulation de l'interaction Tau-DDX5

Nous avons également démontré que l'interaction Tau-DDX5 est modulée par les ARN. L'importance des ARN dans la régulation de l'interaction de DDX5 avec d'autres protéines avait été préalablement décrite (Yao *et al.*, 2010; Geißler *et al.*, 2013). Contrairement aux résultats obtenus, ces études révèlent que les traitements RNase déstabilisent l'interaction entre DDX5 et ses partenaires. De façon intéressante, nous avons également mis en évidence que l'ARN long non codant SRA renforce l'interaction entre Tau et DDX5. L'ensemble de ces résultats permet de souligner

l'importance des ARN dans l'interaction Tau-DDX5 et laisse supposer que tous les ARN ne jouent pas le même rôle dans cette interaction. En effet, certains ARN pourraient limiter l'interaction tandis que d'autres, comme SRA, pourraient la renforcer. D'ailleurs, l'utilisation de l'ARN long non codant H19 comme contrôle négatif de cette expérience a donné des résultats inattendus. En effet, la surexpression de H19 semble déstabiliser l'interaction entre Tau et DDX5. Ces résultats renforcent l'idée que certains ARN puissent réguler négativement l'interaction entre les deux protéines à l'image des résultats obtenus après nos traitements à la RNase. H19 pourrait donc être un bon candidat comme ARN modulant négativement l'interaction entre Tau et DDX5. L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existerait des ARN long non codants régulateurs positifs et négatifs de l'interaction entre nos deux protéines d'intérêt.

Concernant nos résultats obtenus pour l'ARN long non codant SRA, un rôle similaire de l'ARN a été décrit pour l'interaction entre les protéines DDX5 et CTCF. En effet, la déplétion de SRA en lignée HeLa entraîne une diminution de 30% de l'interaction entre les deux protéines induisant une perte de la fonction insulatrice de CTCF (Yao *et al.*, 2010). D'autres études ont mis en évidence l'importance des ARN long non codants dans la régulation de l'activité des hélicases. En effet, DDX5 et DDX17 sont connues pour agir en synergie avec SRA afin de co-activer le facteur de transcription MyoD lors de la différenciation des cellules musculaires squelettiques (Caretto *et al.*, 2006). Récemment, des travaux ont montré le rôle essentiel de l'ARN long non codant mexis dans l'interaction de DDX17 avec ses partenaires modulant ainsi son activité dans la régulation de la transcription (Sallam *et al.*, 2018). De façon intéressante, nous avons également mis en évidence que le rôle de Tau dans la régulation du NMD est dépendant de l'expression de SRA. Ainsi, l'ARN long non codant SRA régule non seulement l'interaction entre Tau et DDX5 mais également l'activité régulatrice de Tau dans la voie NMD.

III. Par quel(s) mécanisme(s) Tau régule la dégradation des ARNm par la voie NMD ?

L'utilisation de différents systèmes rapporteurs, dans les cellules HEK-293T, SH-SY5Y et HeLa, nous a permis de mettre en évidence que la protéine Tau régule positivement la dégradation des ARNm par la voie NMD. Nous avons également démontré une inhibition de l'activité régulatrice de Tau sur la voie NMD lorsque l'expression de DDX5 est diminuée par siRNA suggérant que l'effet de Tau sur le NMD est dépendant de DDX5. Une étude a déjà démontré que DDX5 régule positivement le NMD par son interaction avec différentes protéines régulatrices telles que Upf3B, Upf2 ou encore CBP80. Cette étude démontre également que cet effet de DDX5 sur le NMD n'est pas dépendant de la présence de codon stop prématuré mais de la présence d'une longue région non traduite en 3' des ARNm (3'UTR) (Geißler *et al.*, 2013). En accord avec ces résultats, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de DDX5 seule n'influe pas sur la dégradation des ARNm présentant un PTC. Toutefois, nos résultats mettent en évidence que DDX5 peut intervenir également dans le NMD de façon PTC dépendante via son interaction avec la protéine Tau. Nous avons également mis en évidence que DDX17, malgré sa présence dans le complexe Tau-DDX5, n'est pas impliquée dans la régulation de Tau sur le NMD. Des résultats similaires ont été obtenus concernant l'implication des hélicases dans la co-activation de certains facteurs de transcription. C'est notamment le cas pour p53. Bien que les deux hélicases DDX5 et DDX17 interagissent avec le facteur de transcription, seule DDX5 est impliquée dans l'activité transcriptionnelle de p53 en réponse aux dommages à l'ADN (Bates *et al.*, 2005).

Nos résultats révèlent également une interaction entre Tau et CBP80, une protéine activant la voie NMD lors du premier tour de traduction (Hwang *et al.*, 2010; Ivanov and Anderson, 2010). Ces résultats permettent de suggérer que l'activation du NMD par Tau puisse également se produire à ce moment de la traduction. Nous n'avons pas mis en évidence d'interaction entre Tau et les protéines régulatrices majeures du NMD telles que Upf1, Upf2 ou Upf3B. Toutefois, CBP80 et DDX5 sont capables de lier ces protéines activant, de ce fait, la voie NMD. En effet, CBP80 lie Upf1, située au niveau du complexe SURF, tandis que DDX5 interagit avec Upf3B et Upf2, localisées à l'EJC. Il est intéressant de noter que CBP80 fait partie de l'interactome de DDX5.

Ces différentes données nous permettent d'émettre les hypothèses suivantes : Au cours du premier tour de traduction, lorsqu'un codon stop prématuré est reconnu par le ribosome, la protéine Tau pourrait interagir avec DDX5, de façon SRA dépendante, et CBP80 favorisant leur recrutement au niveau de l'EJC et du complexe SURF respectivement. De par son interaction avec ces différentes protéines, Tau pourrait également jouer le rôle de « pont moléculaire » entre le complexe SURF et l'EJC favorisant ainsi la formation du complexe DECID, une étape primordiale pour l'activation du NMD (Figure 1). Il n'est pas à exclure que Tau pourrait interagir avec CBP80 dès la synthèse de l'ARNm, à l'état basal, puis faciliter l'interaction entre CBP80 et UPF1 après la reconnaissance d'un codon stop prématuré (Figure 1bis).

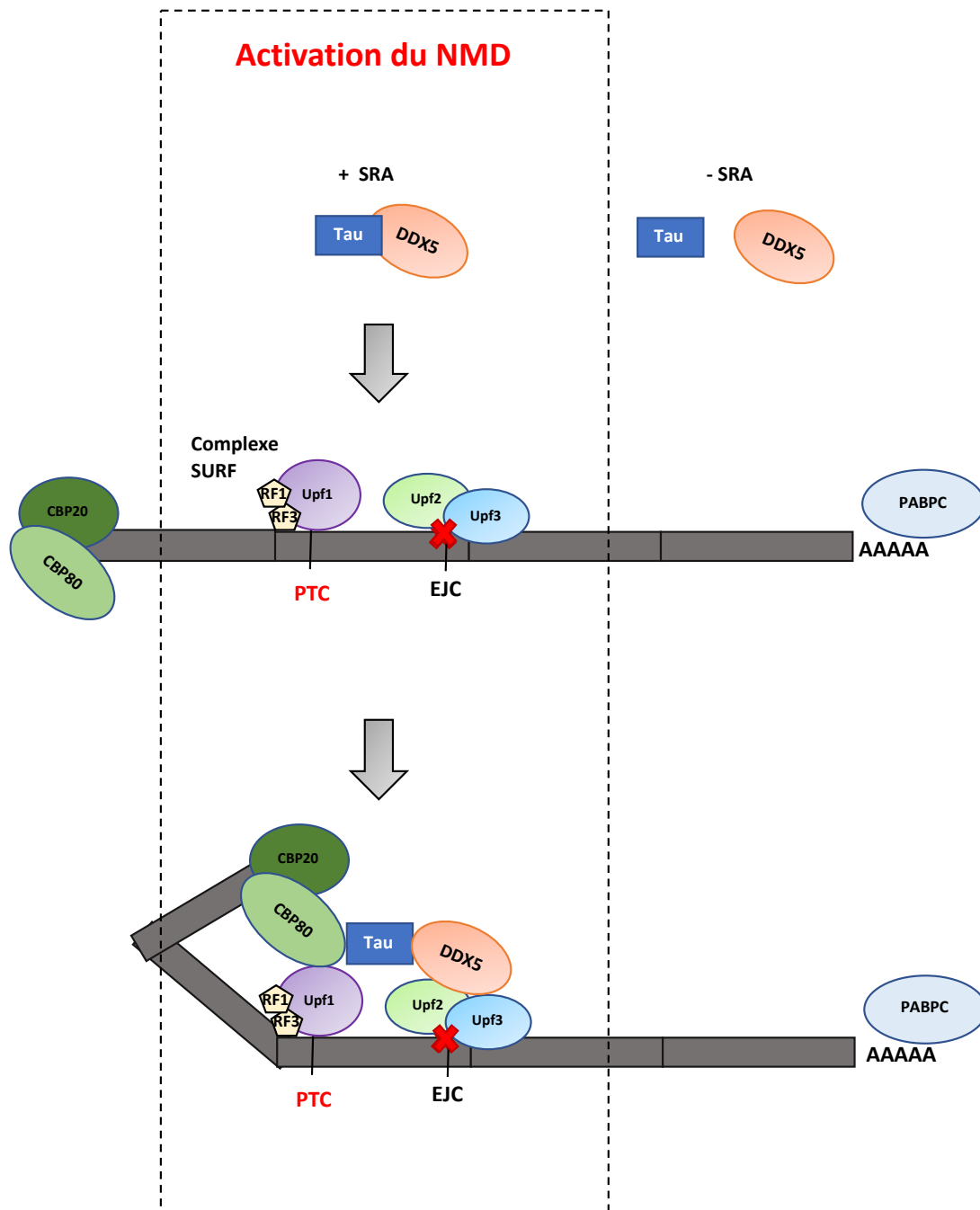


Figure 1 : Activation du NMD par les protéines Tau. Au cours du premier tour de traduction, Tau permettrait le recrutement de DDX5 et CBP80 au niveau des protéines régulatrices du NMD activant, de ce fait, le mécanisme. Tau pourrait également permettre la communication entre les différents complexes protéiques, un phénomène majeur pour l'activation du NMD.

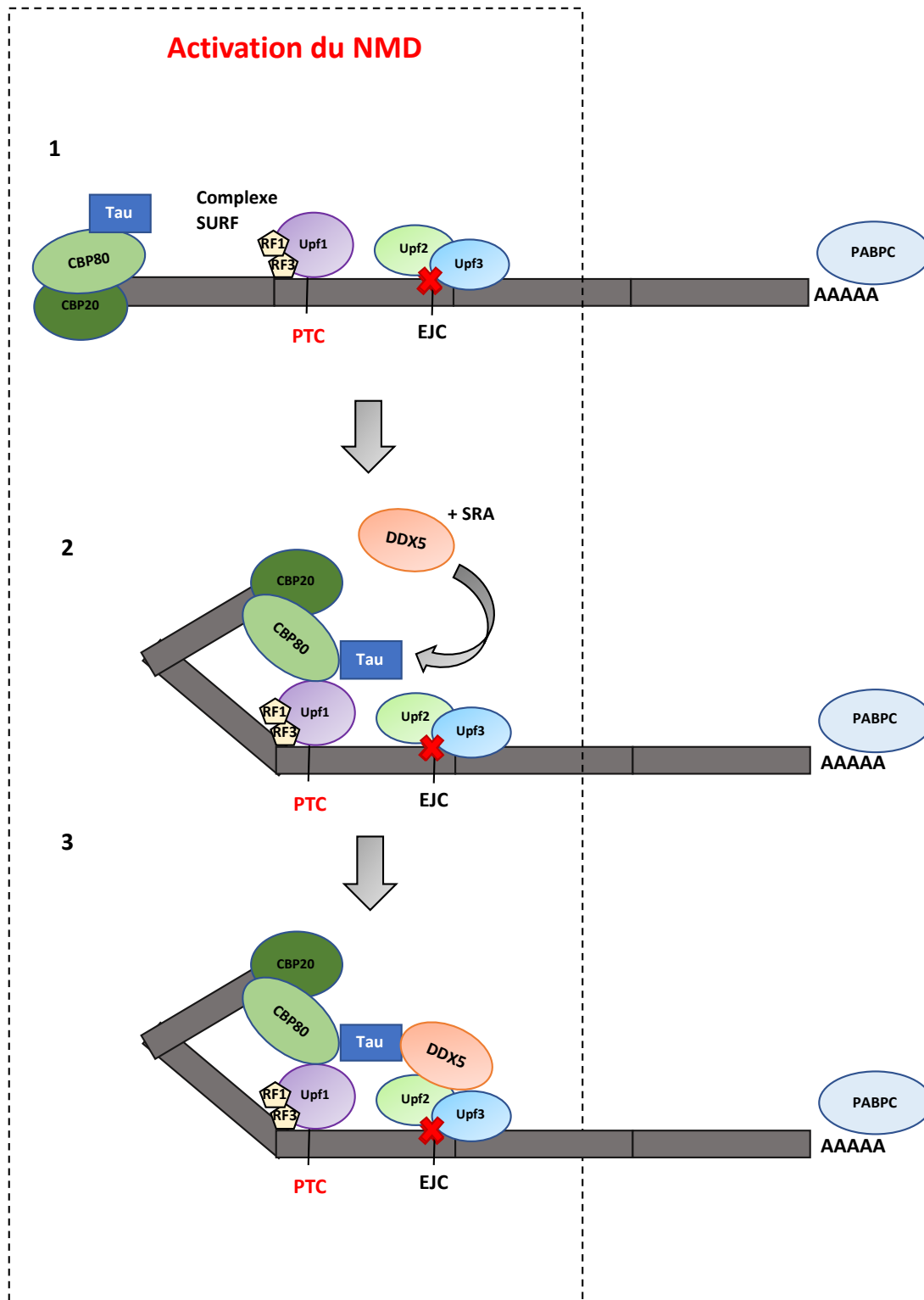


Figure 1 bis : Activation du NMD par les protéines Tau. Tau pourrait également interagir à l'état basal avec CBP80 (1), puis favoriser son interaction avec Upf1 lorsqu'un codon stop prématuré est reconnu par le ribosome (2). DDX5 lierait alors Tau, de façon SRA dépendante, permettant son recrutement au niveau de l'EJC (2). Finalement, Tau favoriserait la communication entre le complexe SURF et l'EJC (3).

IV. Quel est le lien entre Tau et l'épissage ?

Nous avons démontré que Tau régule négativement l'épissage dans les cellules HEK-293T et les cellules HeLa. A ce stade, nous ne savons pas si cette régulation de Tau sur l'épissage est dépendante de l'expression de DDX5 ou de DDX17. D'après la littérature, plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Premièrement, il est établi que l'activité hélicase de DDX5 permet le décrochement de la particule U1 au niveau du transcrite générant la formation d'un spliceosome actif et régulant positivement l'épissage (Liu, 2002). De ce fait, nous pouvons supposer que l'interaction de Tau avec DDX5 pourrait bloquer le domaine hélicase de DDX5 modulant ainsi son activité biologique. Deuxièmement, il est connu que le NMD régule l'expression de protéines impliquées dans l'épissage par le système AS-NMD (*Alternative splicing coupled to NMD*) (Lejeune and Maquat, 2005; Weischenfeldt *et al.*, 2012). Ce système permet en général un rétrocontrôle négatif des transcrits en favorisant l'inclusion ou l'exclusion d'un exon entraînant ainsi l'apparition du codon stop prématuré. On retrouve ce type de régulation notamment pour les facteurs d'épissage PTBP1 et PTBP2 (Wollerton *et al.*, 2004; Boutz *et al.*, 2007). Ainsi, l'activité régulatrice de Tau sur l'épissage observée dans nos résultats pourrait être indirecte en régulant l'expression de ces protéines. D'ailleurs, nos résultats mettent en évidence que Tau régule négativement l'expression des facteurs d'épissage PTBP1 et PTBP2. Par conséquent, les résultats obtenus au cours de cette étude, à savoir la régulation négative de l'épissage par la protéine Tau et son rôle dans la régulation de l'expression des facteurs PTBP1 et PTBP2, permettent de suggérer que la protéine Tau pourrait moduler l'épissage de façon indirecte c'est-à-dire en dégradant les transcrits PTB via l'activation de la voie NMD (Figure 2).

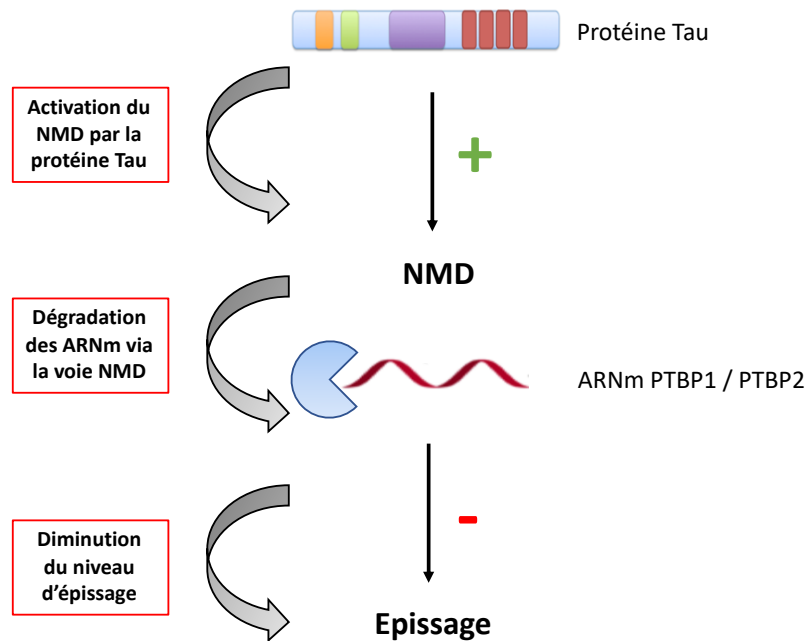


Figure 2 : Régulation de l'épissage par Tau via le système AS-NMD. La régulation positive de Tau sur la voie NMD pourrait réguler l'expression des facteurs d'épissage PTBP1 et/ou PTBP2. La dégradation de ces transcrits modulerait le niveau d'épissage cellulaire en retour.

V. La mutation P301S régule l'activité de Tau dans le métabolisme des ARN

Les mutations P301S et P301L de Tau sont associées aux formes familiales des tauopathies. Nous avons testé l'impact de ces mutations dans la régulation de Tau sur le NMD. Nos résultats montrent que la mutation P301S renforce la régulation positive de Tau sur la voie NMD tandis que la mutation P301L n'a pas d'effet.

Afin de comprendre l'implication de la forme pathologique Tau P301S dans la régulation du NMD, nous avons dans un premier temps supposé que cette mutation pouvait moduler l'interaction entre Tau et DDX5 et donc réguler l'effet de Tau sur la voie NMD. Cependant, une approche par GST-pulldown a démontré que les mutants P301S et P301L de Tau ne modifient pas l'interaction Tau-DDX5. Ces résultats ne sont pas surprenants car nous avons déjà déterminé que l'interaction entre Tau et DDX5 se fait via la partie C-terminale du domaine riche en proline de la protéine Tau tandis que les mutations P301S et P301L sont localisées au niveau du domaine C-terminal de Tau. De façon intéressante, nous avons démontré que la mutation P301S

augmente le niveau de phosphorylation de Tau au niveau des résidus thréonine 231 et sérine 235. Ces résidus sont localisés dans le domaine d'interaction de Tau avec DDX5. Nos résultats nous permettent de supposer que le niveau de phosphorylation de Tau pourrait moduler son interaction avec DDX5 et donc modifier son effet dans la régulation de la voie NMD.

VI. La phosphorylation de Tau régule son activité dans la voie NMD

La création de mutants phosphomimétiques et non phosphomimétiques au niveau de la thréonine 231 a permis de mettre en évidence que le niveau de phosphorylation de Tau au niveau de ce résidu module son effet dans la voie NMD. En effet, l'absence de phosphorylation au niveau de ce site inhibe l'effet de Tau sur le NMD tandis que sa phosphorylation restaure l'effet. Deux hypothèses différentes peuvent expliquer ces résultats.

Premièrement, la phosphorylation de Tau au niveau de la thréonine 231 pourrait réguler directement son interaction avec DDX5 et ainsi activer le NMD. Toutefois, les résultats du GST-pulldown montrent que la phosphorylation de Tau ne module pas son interaction avec DDX5. L'obtention des protéines Tau phosphorylées, utilisées pour le GST-pulldown, a été effectuée par une technique de phosphorylation *in vitro* à partir d'un cerveau de rat. Cette technique phosphoryle Tau au niveau de différents résidus tels que les Ser202, Thr205, Thr231, Ser235, Ser396 (Qi *et al.*, 2016). Cette approche induit donc une phosphorylation globale de Tau et ne permet pas d'étudier l'implication d'un résidu en particulier. Par conséquent, il serait intéressant de tester le rôle de la phosphorylation du résidu 231 seul au moyen d'une autre approche (voir chapitre conclusion-perspectives).

Deuxièmement, la phosphorylation de Tau au niveau de la thréonine 231 pourrait abolir son interaction avec certains de ses partenaires et ainsi augmenter le pool de protéines Tau libres au sein des cellules. Les protéines Tau seraient alors d'avantage disponibles pour interagir avec DDX5 et ainsi activer la voie NMD. D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que la phosphorylation de Tau au niveau de la thréonine 231 diminue largement sa capacité à interagir avec les microtubules (Cho and Johnson, 2004), l'ADN (Qi *et al.*, 2015), les protéines Fyn (Reynolds *et al.*, 2008) et BIN1

(Sottejeau *et al.*, 2015) suggérant que la phosphorylation au niveau de ce site module le nombre de protéines Tau disponible au sein des cellules (Figure 3).

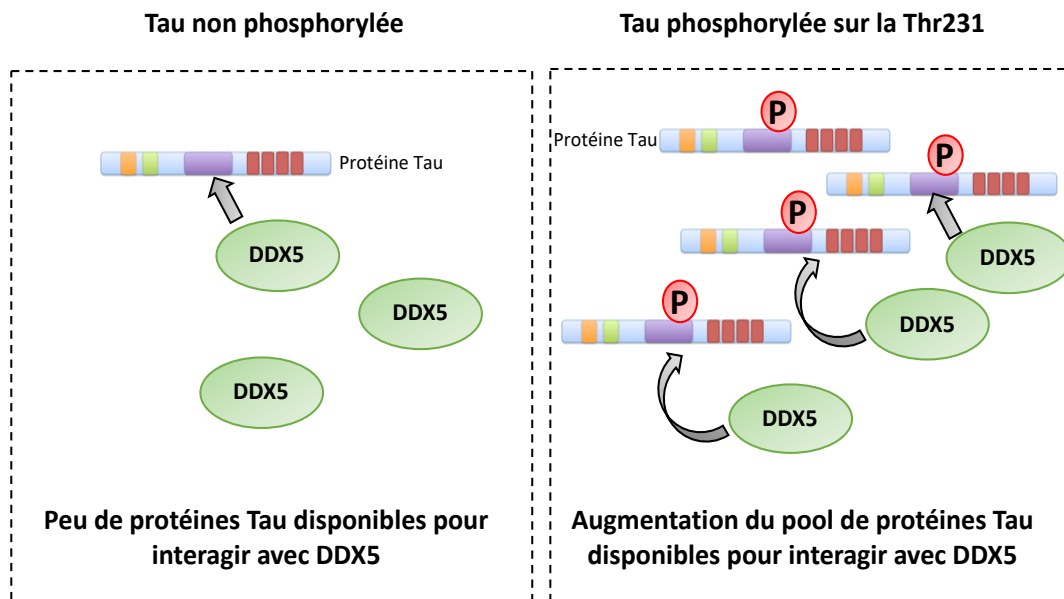


Figure 3 : Schéma explicatif de notre deuxième hypothèse concernant l'effet de la phosphorylation de Tau sur son interaction avec DDX5. Lorsque Tau n'est pas (ou peu) phosphorylée, une faible quantité de protéines Tau serait alors disponible pour interagir avec DDX5 et activer le NMD. La protéine Tau phosphorylée au niveau de la thréonine 231 détache cette dernière de ses partenaires canoniques et augmente le pool de protéines Tau libres. Dans ces conditions, les protéines Tau seraient alors d'avantage disponibles pour interagir avec DDX5 et activer la voie NMD.

VII. Le complexe Tau-DDX5 en condition pathologique

Les différents résultats que nous avons obtenus, concernant les mutants Tau P301S et la co-localisation de DDX5 avec les protéines Tau pathologiques, permettent de suggérer une altération des mécanismes régulés par le complexe Tau-DDX5 dans les tauopathies. D'ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence un dysfonctionnement de l'épissage et du NMD dans les maladies neurodégénératives et dans certaines tauopathies (voir introduction chapitre 4).

Ces résultats couplés aux données bibliographiques nous permettent de formuler différentes hypothèses concernant le comportement du complexe Tau-DDX5 dans les tauopathies. Lors des stades précoces de la pathologie, la protéine Tau

hyperphosphorylée mais pas encore agrégée pourrait dégrader certains transcrits aberrants par l'activation de la voie NMD suite à son interaction avec DDX5. Par exemple, l'activation du NMD pourrait remédier à la surexpression des facteurs PTB, un phénomène décrit dès les premiers stades du développement des tauopathies (Tollervey *et al.*, 2011; Wong, 2013). La régulation de l'expression de certains facteurs d'épissage pourrait ainsi retarder les dysfonctionnements de l'épissage cellulaire observés dans les tauopathies. Toutefois, lorsque les complexes Tau-DDX5 se retrouvent piégés au sein des agrégats, ils ne seraient alors plus en mesure d'activer la voie NMD participant, de ce fait, aux dérèglements du métabolisme des ARN observés dans les tauopathies.

CONCLUSION – PERSPECTIVES

En conclusion ce projet de recherche a permis d'identifier de nouveaux partenaires de Tau, tels que DDX5 et DDX17, et de mettre en évidence pour la première fois l'implication de Tau dans l'épissage et la dégradation des ARNm par la voie NMD. Dans l'ensemble, ces résultats permettent de suggérer que les dysfonctionnements de Tau, observés lors du développement des tauopathies, pourraient aboutir aux dérégulations du métabolisme des ARN identifiés dans ces pathologies.

Certains résultats doivent encore être approfondis afin d'éclaircir le fonctionnement des mécanismes révélés au cours de cette étude. Pour cela, plusieurs perspectives d'études sont réalisables.

I. Déterminer les ARN non codants régulant l'interaction Tau-DDX5

Nous avons identifié l'ARN long non codant SRA comme régulateur clé de l'interaction entre Tau et DDX5. En effet, cet ARN favorise la formation du complexe Tau-DDX5 et régule également l'effet de Tau dans l'activation du NMD. Nos résultats révèlent que d'autres ARN semblent être impliqués dans ces mécanismes, notamment H19 qui semble réguler négativement l'interaction entre Tau et DDX5. Il serait intéressant de réitérer les expériences de streptavidine-pulldown après surexpression de H19 afin de confirmer son rôle négatif dans l'interaction entre les deux protéines. Une approche par RIP (*RNA immunoprecipitation*) sequencing permettrait d'identifier le potentiel panel d'ARN pouvant réguler l'interaction entre Tau et DDX5. Il serait également intéressant de déterminer si la présence de DDX17 dans le complexe est dépendante des ARN non codants.

II. Quels sont les sites de phosphorylation modulant l'activité du complexe Tau-DDX5 ?

Le niveau de phosphorylation de Tau au niveau de la thréonine 231 joue un rôle essentiel dans la régulation de la voie NMD. Par conséquent, il serait intéressant de tester l'impact de la phosphorylation de la thréonine 231 dans l'interaction entre nos deux protéines d'intérêt. Pour cela, une approche par GST-pulldown, à partir de DDX5 produite *in vitro* et de mutants phosphomimétiques et non phosphomimétiques de Tau au niveau de ce site, pourrait être effectuée. D'autres sites de phosphorylation

pourraient être testés par cette technique. C'est le cas notamment pour les sérines 235 et 237. Elles sont situées dans le domaine d'interaction entre Tau et DDX5 et sont phosphorylées dans les tauopathies (Avila, 2009).

III. Déterminer si l'effet de Tau dans l'épissage est NMD-dépendant

Nos résultats mettent en évidence que la surexpression de la protéine Tau entraîne une diminution de l'épissage. Actuellement, nous ne savons pas si cette régulation de Tau sur l'épissage est directe ou NMD-dépendante. Il serait intéressant de tester cela en réitérant cette expérience après avoir inhiber la voie NMD par la transfection de siRNA dirigés contre Upf1. Les résultats de cette expérience seraient d'autant plus intéressants qu'il est déjà connu que le NMD peut réguler l'expression de différentes protéines impliquées dans l'épissage par le système « Alternative splicing coupled to NMD » (AS-NMD). D'ailleurs, nos résultats révèlent que la surexpression de Tau entraîne une diminution de l'expression des facteurs d'épissage PTBP1 et PTBP2, dont l'expression est contrôlée par le système AS-NMD. De ce fait, réitérer cette expérience après avoir inhibé la voie NMD permettrait de déterminer si le rôle de Tau dans la régulation de l'expression de ces protéines dépend de l'activation de la voie NMD en amont.

IV. Le complexe Tau-DDX5 dans les tauopathies

1. *Études à partir de tissus humains*

Une approche par immunofluorescence, à partir de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, nous a permis de mettre en évidence une colocalisation entre DDX5 et les protéines Tau pathologiques (hyperphosphorylées) suggérant un dysfonctionnement de DDX5 dans les tauopathies sporadiques. Ces résultats pourraient être complétés par la réalisation de nouvelles immunofluorescences à partir de tissus provenant de patients atteints de formes familiales de tauopathies. Ainsi, l'étude des FTDP-17 serait particulièrement intéressante car nous avons démontré au cours de ce projet l'importance des mutations P301S et P301L dans la régulation des mécanismes régulés par Tau.

2. Études à partir de modèles murins

L'étude du complexe Tau-DDX5 dans les tauopathies pourrait être approfondis par l'utilisation de souris Thy-Tau22, un modèle mimant la pathologie Tau. Ces souris surexpriment une protéine Tau humaine contenant les mutations P301S et G272V favorisant son hyperphosphorylation et son agrégation dans les neurones. L'expression et la localisation des différents partenaires de Tau : DDX5, DDX17, SRA et CBP80 pourraient être étudiées dans ce modèle. Par ailleurs, différentes expériences pourraient être effectuées afin de tester l'impact du NMD dans la progression de la pathologie Tau. Premièrement, le niveau de toxicité cellulaire lié aux agrégats Tau pourrait être évalué avant et après la surexpression de Upf1 (activation du NMD) dans des cultures primaires de neurones de souris Thy-Tau22 et Wild-type. Deuxièmement, une évaluation des capacités cognitives des souris Thy-Tau22 pourrait être effectuée après activation du NMD par l'injection intra-craniale de lentivirus codant pour Upf1.

V. L'activation de la voie NMD par le complexe Tau-DDX5 régule la différenciation cellulaire ?

Les ARN hélicases DDX5 et DDX17 contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. Elles participent notamment à la différenciation des ostéoblastes (Jensen *et al.*, 2008), des cellules musculaires squelettiques (Caretti *et al.*, 2006) et des neuroblastomes (Lambert *et al.*, 2018). Le système NMD est également impliqué dans la différenciation cellulaire. En effet, l'activité de la voie NMD est régulée au cours de la différenciation neuronale permettant l'expression de gènes importants pour ce mécanisme (Bruno *et al.*, 2011). De façon intéressante, cette étude révèle également que la régulation de la voie NMD au cours de la différenciation résulte de la dégradation des protéines Upf1 par le micro ARN 128 dont l'expression est connue pour être altérée dans la maladie d'Alzheimer (Lukiw, 2007). Plus récemment, une autre étude a mis en évidence que l'inhibition du NMD dans des cellules souches embryonnaires murines altère la différenciation cellulaire (Li *et al.*, 2015). L'ensemble de ces résultats nous permet de supposer que l'activation de la voie NMD par le complexe Tau-DDX5 pourrait réguler la différenciation cellulaire. Par ailleurs, le niveau de phosphorylation de Tau est modulé au cours de la différenciation

des cellules. En effet, une augmentation de la phosphorylation de Tau au niveau des résidus sérines 195, 198, 199, 202, 396 et 404 est observée lors de la différenciation des cellules de neuroblastome tandis qu'une baisse de la phosphorylation des sérines 262 et 256 a été identifiée (Haque *et al.*, 1999). Les résultats de cette étude couplés à nos observations, à savoir que l'effet de Tau sur la voie NMD est phospho-dépendant, renforcent l'idée d'une possible implication du complexe Tau-DDX5 dans la régulation de la différenciation neuronale via l'activation du NMD.

Nous avons étudié l'expression des hélicases DDX5 et DDX17 au cours de la différenciation dans des cultures primaires de cortex de souris. Les résultats préliminaires montrent une expression constante des deux hélicases au cours de la différenciation (Figure 4). Ces données suggèrent que la formation du complexe Tau-DDX5 au cours de la différenciation ne serait pas dépendante de l'expression de l'hélicase mais plutôt du niveau de phosphorylation de Tau, connu pour être modulé au cours de cet événement. Ces résultats doivent être confirmés et validés par l'étude de l'expression de marqueurs de la différenciation neuronale.

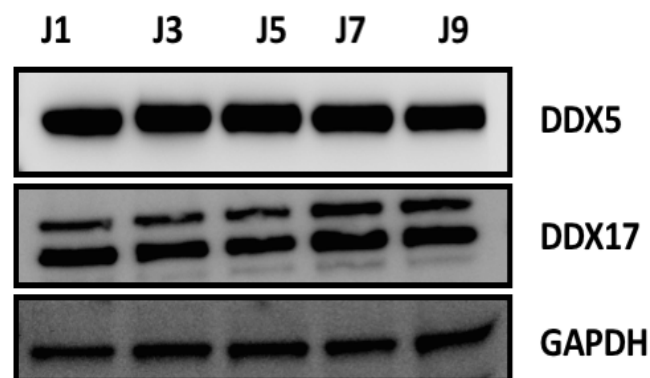


Figure 1 : Expression des hélicases DDX5 et DDX17 au cours de la différenciation neuronale. Étude de l'expression de DDX5 et DDX17 par western-blot effectué à partir de cultures primaires de cortex d'embryons de souris et révélé à l'aide des anticorps anti-DDX5 et anti-DDX17. Les cellules ont été lysées tous les 3 jours et l'anticorps anti-GAPDH a été utilisé comme contrôle de charge.

D'autres travaux ont étudié l'expression des hélicases au cours de la différenciation neuronale dans des cellules de neuroblastome et ont mis en évidence une répression de l'expression de DDX5 et DDX17 au cours de ce processus (Lambert *et al.*, 2018). Ces résultats ont été confirmés notamment dans la différenciation des cellules musculaires (Dardenne *et al.*, 2014) et sont associés à l'augmentation de certains micro ARN modulant l'expression des hélicases. Ces différentes études s'opposent aux résultats obtenus dans d'autres travaux où il a été déterminé que l'expression des hélicases est primordiale pour la différenciation des cellules musculaires (Caretto *et al.*, 2006) et la transition épithelio-mésenchymateuse (Yang, Lin and Liu, 2006). En effet, l'inhibition de l'expression de DDX5 et DDX17 par shRNA inhibe la différenciation cellulaire (Caretto *et al.*, 2006). Ainsi, bien qu'il paraît évident que les hélicases jouent un rôle crucial dans la différenciation cellulaire, il reste encore beaucoup de zones d'ombres concernant les mécanismes moléculaires à l'origine de cet événement complexe.

PARTIE 2

I. Introduction

L'étude de l'interactome de Tau par stratégie Tap-tag couplée à de la spectrométrie de masse, nous a permis d'identifier DDX5 et DDX6 comme nouveaux partenaires protéiques des protéines Tau. L'étude du complexe Tau-DDX6 a fait l'objet d'un autre projet auquel j'ai participé. DDX6 est une ARN hélicase à boîte DEAD impliquée dans la répression de la traduction et dans la régulation de l'expression génique par l'intermédiaire des microARN. Au cours de ce projet, nous avons caractérisé l'interaction entre les deux protéines et nous avons déterminé la fonction du complexe Tau-DDX6 en condition physiologique et son rôle dans le développement des tauopathies.

II. Résultats

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le journal « *BBA – Gene Regulatory Mechanisms* ». Les résultats sont présentés sous la forme d'un article :

Tau/DDX6 interaction increases microRNA activity

Alban Chauderlier*(1), Melissa Gilles*(1), Andrea Spolcova (1), Raphaelle Caillierez (1), Maggy Chwastyniak (3), Michel Kress (4), Herve Drobecq (5), Eliette Bonnefoy (2), Florence Pinet (3), Dominique Weil (4), Luc Buée (1), Marie-Christine Galas (1), Bruno Lefebvre **(1)

(1) Université de Lille, Inserm, CHU-Lille, UMRS1172, Alzheimer & Tauopathies, Lille, France.

(2) Université Paris Descartes, Centre Interdisciplinaire Chimie Biologie-Paris, Inserm UMRS1007, Paris, France.

(3) INSERM U1167, FHU-RMOD-HF, Institut Pasteur de Lille, University Lille Nord de France 59000 Lille, France.

(4) Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Laboratoire de Biologie du Développement, F-75005 Paris, France.

(5) University of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), CNRS UMR8204, Chemistry and Biology of Flatworms (CBF), F-59000 Lille, France.

* equal contribution

** corresponding author : bruno.lefebvre@inserm.fr

Keywords: Tau protein, Tauopathies, DDX6, let-7a, miR-21, miR-124, translational repression

ABSTRACT

Tauopathies, such as Alzheimer's disease, are characterized by intracellular aggregates of insoluble Tau proteins. Originally described as a microtubule binding protein, recent studies demonstrated additional physiological roles for Tau. The fact that a single protein can regulate multiple cellular functions has posed challenge in terms of understanding mechanistic cues behind the pathology. Here, we used tandem-affinity purification methodology coupled to mass spectrometry to identify novel interaction partners. We found that Tau interacts with DDX6, a DEAD box RNA helicase involved in translation repression and mRNA decay as well as in the miRNA pathway. Our results demonstrate that Tau increases the silencing activity of the miRNA let-7a, miR-21 and miR-124 through DDX6. Importantly, Tau mutations (P301S, P301L) found in the inherited tauopathies, frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17, disrupt Tau/DDX6 interaction and impair gene silencing by let-7a. Altogether, these data demonstrated a new unexpected role for Tau in regulating miRNA .

1. INTRODUCTION

Historically, Tau was described as a microtubule associated protein [1]. Aggregation of intracellular Tau (neurofibrillary tangles, NFTs), which is one of the main characteristics of several cognitive disorders, including Alzheimer's disease and primary tauopathies, has raised considerable interest for this protein [2, 3]. Several mutations in the MAPT (Microtubule-Associated Protein Tau) gene identified in the inherited frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17) has established that Tau dysfunction is central to the neurodegenerative process [4, 5]. Over the past decades, much effort has been devoted to understand the mechanisms downstream of Tau that promote neuronal dysfunction and death of neurons. Phosphorylation at many sites appears to precede assembly into neurofibrillary tangles (NFTs) leading to Tau detachment from microtubules [6-8]. However, detailed analysis of several animal models of tauopathies indicated that microtubule disassembly and disrupted axonal transport are not the only mechanisms involved in the neurodegenerative process. Numerous studies have demonstrated that Tau relocalization upon microtubule detachment interfere with several neuronal processes including signaling pathways, synaptic functions, impaired neurogenesis, neuron to neuron propagation and seeding of the NFTs, dysfunction of RNA metabolism as well as contribution to the neuroinflammatory responses [9-16]. Despite these evidences linking Tau to neurodegeneration, the physiological roles of this protein are still incompletely understood. Recent advances have led to reconsider Tau as a multifunctional protein involved in several cellular pathways such as signal transduction, DNA/RNA protection, genomic stability, regulation of normal synaptic function and organization of neuronal pericentromeric heterochromatin [17-24].

To gain insights into new physiological roles of Tau, we generated stable neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y) expressing a tagged version of this protein. A tandem affinity purification combined with mass spectrometry was used to purify and identify new Tau interactors. This approach allowed us to identify DDX6, a multifunctional protein member of the highly conserved DEAD box RNA helicase family. DDX6 is involved in translation repression and RNA decay. It is also required for the assembly of processing-bodies (P-bodies), a class of RNP granules found in somatic cells [25]. Structurally, DDX6 contains several conserved sequence motifs associated with ATP-dependent unwinding and RNA binding activities. It has been demonstrated that DDX6 impacts on RNA metabolism in several ways. DDX6 was shown to interact with the decapping complex facilitating both general and specific mRNA decay. Stabilization of the decapping complex or the stimulation of the Dcp2 catalysis are thought to be part of the mechanism [26, 27]. Previous research also demonstrated that DDX6 is involved in translational repression [25, 28]. More recently, DDX6

was shown to be necessary for efficient miRISC-dependent repression [29, 30]. Although the mechanisms have been not fully elucidated, it has been demonstrated that CCR4-NOT present in the miRISC complex recruited DDX6 and thus provide a link between translational inhibition and decapping [28, 31-33].

Here we provide evidences that Tau binds directly to DDX6 *in vitro* and *in cellulo*. The interaction involves the C-terminal (C-t) part of the proline rich domain and the third repeat of the microtubule domain of Tau. Our results demonstrate that Tau/DDX6 interaction does not affect the general translational repression mediated by DDX6 but increases microRNA (miRNA) miR-21, miR-124 and let-7 silencing activity. Using the let-7a target gene c-myc as a model, we showed that this effect occur through miRNA translational repression. Importantly, we find that the most common Tau mutant P301L and P301S involved in FTDP-17 disrupt the Tau binding to DDX6 and impaired let-7 miRISC-mediated gene silencing. Taken together, these data demonstrated a new unexpected role for Tau in regulating miRNA activity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and plasmids

The expression vectors pcDNA3.1-Tau1N4R-WT, pcDNA3.1-Tau1N4R-P301S, pcDNA3.1-Tau1N4R-P301L and pCI-DDX6 were described elsewhere [25, 34]. pcDNA3.1D-Firefly-Let-7a (Let-7a-Sensor) or pcDNA3.1D-Firefly-Let-7a-mut (Mut-Let-7a-Sensor) were kindly provided by S. Diederichs (DKFZ, Heidelberg, Germany). pGEX vectors encoding DDX6 or Tau were kind gift from D. Weil (CNRS, IBPS, Paris, France) and J.C. Lambert (INSERM U1167, Lille, France) respectively. p-cmyc 3'UTR, p-miR-21-5p-luc and p-miR-124-3p-luc were purchased from Active Motif. DDX6 siRNA (DDX6 ON-TARGET plus SMART pool) and negative control siRNA (ON-TARGET plus non-targeting pool) were purchased from Dharmacon (GE Healthcare). Tau mutants were constructed by site directed mutagenesis (QuikChange, Agilent Technologies) following the manufacturer's protocol using pGEX-PRD, pGEX-4R as templates. Specific oligonucleotides were used to mutate Tau residues 226V, 229V, 311K, 317K and 321K into glycine. All constructs were verified by automated sequencing.

2.2. Cell culture and transfection

SH-SY5Y human neuroblastoma cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine and 50U/ml penicillin/streptomycin (Gibco) at 37°C in 5% CO₂ humidified air. Transient transfection experiments were performed using the Lipofectamine 2000 or Lipofectamine 3000 reagents (Invitrogen). Luciferase assays were

performed with the dual-luciferase assay system (Promega) or The LightSwitch Luciferase Assay Kit (Active Motif) according to manufacturer's guidelines.

2.3. Tandem affinity purification

Cells expressing a TAP-tagged Tau1N4R or 1N3R were expanded in 15-cm dishes. Cells were harvested, washed with PBS, resuspended in buffer A (10mM Hepes pH=7.8, 10mM KCl, 0,5mM EDTA, 1mM DTT, completed and complete protease inhibitors [Roche]). Nuclei were recovered by centrifugation 10 min at 2000g, resuspended in nuclear lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.4, 1.5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 26% glycerol, 1 mM dithiothreitol [DTT] and complete protease inhibitors [Roche]), and then incubated for 1 h in a rotation wheel at 4 °C to extract nuclear proteins. Cytoplasmic or nuclear lysates were incubated overnight at 4°C with Dynabeads M-270 Streptavidin resin (Life Technologies) in a rotation wheel. Bound proteins were washed extensively with washing buffer (50mM Tris pH=7.8, 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,05% NP40) and eluted by boiling in SDS loading buffer for western-blot analysis or eluted with 1mM biotin for mass spectrometric analysis. In this case, biotin eluted proteins were incubated overnight with calmodulin Sepharose (Amersham) in the presence of 2 mM CaCl₂ at 4 °C in a rotation wheel. After extensive washes with washing buffer, calmodulin-bound proteins were eluted by boiling in SDS loading buffer.

2.4. GST-pulldown experiments

GST-pulldown experiments were performed as described previously [35]. *In vitro* translated proteins were produced using a coupled transcription–translation system (Promega TNT) according to the manufacturer's instructions. For each experiments, GST proteins level was controlled by ponceau red staining.

2.5. Immunofluorescence

Sagittal 5 µM 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: AT8 (Thermo Scientific), AT100 (Thermo Scientific), DDX6 (Bethyl Laboratories, inc). AT8 and AT100 antibodies recognize Tau phosphorylated respectively at epitope Ser202/Thr205 or Ser212/Thr214 and aggregated in sarkosyl-insoluble paired helical filaments (PHF). 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). The hippocampal sections were analyzed with a Zeiss LSM710 confocal laser-scanning microscope (40x magnification) as previously described [20].

2.6. Proximity ligation assay

Proximity ligation assay was performed using duolink proximity ligation assay kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's guidelines. Tau5 (ThermoFisher) and DDX6 (Bethyl Laboratories, inc) were used to visualize Tau-DDX6 proximity.

2.7. RNA preparation and Real-Time PCR

SH-SY5Y cells were grown as described above. Total RNA or miRNA was prepared using Nucleospin RNA kit (Machery-Nagel) or high pure miRNA isolation kit (Roche) respectively. Purified RNA was adjusted to 1 µg/µl, and its integrity was assessed by gel electrophoresis. Reverse transcription was performed using random hexamers as recommended by the manufacturer (Applied Biosystems). cDNAs were analyzed by PCR amplification using the TaqMan PCR master mix of GusB and hmyc primers and probes (Applied Biosystems). For qPCR of miRNAs, miRNA was converted to cDNA using the TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real time PCR was then performed with the reverse transcription products, TaqMan 2× Universal PCR Master Mix without UNG Amperase (Applied Biosystems), miRNA-specific TaqMan probes, and primers (Applied Biosystems). Reactions (40 cycles) and data analysis were carried out with a StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems).

2.8. Western-blot analysis

Proteins were solubilized in SDS loading buffer and analyzed by SDS-PAGE. Primary antibodies used in Western blotting experiments were directed against DDX6 antibody (Bethyl), Tau Cter, β-actin (Sigma) and c-myc (Cell Signaling). Secondary antibodies coupled to HRP were from Sigma-Aldrich. Immune complexes were detected using the ECL+ system from Amersham/GE Healthcare and observed with an Image Reader LAS4000 (Fujifilm). Quantification was performed by densitometry using ImageJ software.

2.9. Protein identification by mass spectrometry

Proteins were separated under reducing conditions in a 10% polyacrylamide NuPage gel. The gel was stained for 3 days in a solution of colloidal Coomassie blue. Stained bands were excised from the gel, reduced, alkylated with iodoacetamide (10 mg/ml in NH₄HCO₃ 20 mM) and digested overnight with 50 ng trypsin (Promega) in 20 mM NH₄HCO₃. The resulting peptides mixtures were eluted from the gel, desalted, and spotted on a MALDI plate with freshly dissolved α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (10 mg/ml in 50% CH₃CN, TFA 1/1000). Mass spectrometry was performed with a MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics). MS and MS/MS data were analyzed using BioTools software. Identification of peptides was performed using Mascot, <http://www.matrixscience.com/>

2.10. Human brains

Human brain samples were obtained from the Lille Neurobank which was given 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).

2.10. Statistical analysis

Data are mean \pm SEM. Statistical tests were carried out using GraphPad Prism software (GraphPAD Inc.). Statistical significance between groups was analyzed with Wilcoxon-Mann-Whitney test and Mann-Whitney tests. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

3. RESULTS

3.1. Tau interacts with the DEAD box RNA helicase DDX6.

To gain insights into Tau protein functions and identified new protein partners, we first applied a strategy based on tandem affinity purification (TAP) coupled to mass spectrometry analysis (MS). Plasmid encoding N-terminally TAP-tagged (streptavidin and calmodulin binding proteins) Tau 1N4R was used to generate stable clone in SH-SY5Y cells. Expanded cell clones were subjected to tandem affinity protein complex purification under mild conditions using two specific binding and elution steps. Affinity purified proteins were then resolved on SDS-PAGE, the bands were excised from the gel and identified by peptide sequence determination using tandem mass spectrometry. Among the identified Tau interacting proteins, the DEAD box RNA helicase DDX6 was found as a major band on gels (data not shown). The interaction of Tau with DDX6 was first confirmed in SH-SY5Y cells overexpressing the TAP tagged version of Tau. Streptavidin affinity binding experiments were performed on cellular extracts. As shown in Figure 1A and B, Tau protein interacted specifically with DDX6 in whole cell as well as in cytoplasmic and nuclear extracts. Similar results were obtained using RNase A-treated extracts and for SH-SY5Y cell overexpressing Tau 1N3R isoform (data not shown). To further validate the observed interaction, we next tested the interaction between an immobilized glutathione S-transferase (GST) Tau or DDX6 fusion proteins and *in vitro* translated DDX6 or Tau respectively. GST pulldown assays revealed that DDX6 interacted with the GST-Tau fusion protein but not with the GST alone (Figure 1C). Similarly, *in vitro* translated Tau interacted specifically with GST-DDX6 (Figure 1D). Finally, a proximity ligation assay (PLA) was performed to specifically detect Tau-DDX6 interaction in SH-SY5Y cells. The PLA signal

from endogenous Tau and DDX6 proteins was detected both in the cytoplasm and nucleus, with a majority in the cytoplasmic compartment (Figure 1E).

Taken together, these data showed that Tau interacts with DDX6 both *in vitro* and *in cellulo*.

3.2. Identification of Tau and DDX6-interacting domains.

To identify Tau domains involved in the interaction with DDX6, we first used a series of Tau deletion mutants fused to GST protein, corresponding to the N-terminal part (1-152), the proline-rich domain (153-243) and the microtubule-binding domain (244-241) of Tau (Figure 2A). Full length DDX6 was translated *in vitro* and GST-pulldown analyses were performed as described previously. As shown in Figure 2B, Tau deletion mutant 1-152 failed to interact with the wild-type DDX6 while a strong interaction was detected for Tau fragments 153-243 and 243-441. To identify more precisely the different interacting domains, we next generated several deletion mutants of from these two regions. Mutants 153-224, 153-199 and 153-182 failed to bind DDX6 protein *in vitro* suggesting that a Tau interacting domain was located between the amino acids 199 and 224 (Figure 2C). The same type of approach was performed for the 244-441 fragment. Deletion analysis revealed that the interaction between Tau and DDX6 was localized within the 302-338 region (Figure 2D). Further analysis indicated several hydrophobic amino acids in the 224-243 region. We thus introduced double glycine substitutions in the GST-Tau(153-243) fusion protein generating GST-Tau(153-243) V226G/V229G. The activity of these mutants was then assayed in GST-pulldown analysis. As shown in Figure 2E, we observed a 51% decrease in the interaction when the two residues were mutated. In the same way, we identified several positively charged residues in the 302-338 region. Point mutations of three lysine residues (311, 317 and 321) into glycine completely abolished the interaction with DDX6 (Figure 2F). Point mutations were next introduced in the full-length Tau (V226G/V229G and K311G/K317G/K321G), translated *in vitro* and tested for the interaction with an immobilized GST-DDX6 fusion protein. As shown in Figure 2G, the different mutations completely abolished the interaction between Tau and DDX6. We next sought to delineate the region(s) in DDX6 that interact with Tau. For this, the DDX6 N-terminal (amino acids 1-288) and C-terminal (amino acids 288-483) RecA domains were separately translated *in vitro*. GST-pulldown analysis using GST-Tau fusion protein revealed that the two domains were required together for the interaction (Figure 2H).

Collectively, these results showed that Tau and DDX6 directly associate via several motifs and identify point mutations that disrupt their interaction.

3.3. Tau/DDX6 interaction stimulates miRNA activity.

It has been demonstrated that DDX6 functions as a general repressor of mRNA translation [25, 28]. To assess a possible regulation of this activity, we performed a HA/NHA tether assay. DDX6 was fused to the lambda-phage N-peptide that allows binding to the BoxB stem-loop sequence inserted in the 3'UTR of the renilla luciferase gene. DDX6 repressed the luciferase activity by 75%, as previously observed in HEK293T cells [36]. However, no change was observed when overexpressing Tau (supplemental Figure 1). Thus, we confirmed that DDX6 represses mRNA expression when recruited to target RNAs in SH-SY5Y, but this effect was not regulated by the interaction with Tau.

Given that DDX6 has been also implicated in the regulation of microRNAs, we next sought out to investigate if Tau/DDX6 could regulate their activities. For this, SH-SY5Y cells were cotransfected with a plasmid encoding wild-type (WT) Tau or an empty vector and firefly luciferase reporter containing four WT or four mutated let-7a binding sites or control firefly luciferase or miR-21/miR-124 luciferase reporter. The comparison of the activity between the WT let-7a or miR-21/124 and mutated let-7a response elements or control gave us a measure of the different mi-RNA activities. A renilla luciferase construct was used as transfection control. As expected, normalized luciferase activity was markedly reduced (95%, 90% and 70% decrease for let-7a, miR-21 and miR-124 respectively) in the presence of the WT let-7a, miR-21 or 124 binding sites, and it further decreased when Tau was overexpressed (Figure 3A). Taken together, these data indicate that Tau stimulated let-7a, miR-21 and miR-124 activities. If the Tau/DDX6 interaction is required for this activity, one would predict that siRNA-mediated down-regulation of DDX6 would alleviate this effect. DDX6 si-RNA mediated knock-down was shown to be effective reaching 50% depletion compared to control (Figure 3B). While DDX6 depletion did not significantly modify the let-7a activity in control condition, it completely suppressed the repression induced by Tau (Figure 3C). RT-qPCR analysis showed that the level of mature let-7a, miR-21 and miR-124 remained unchanged in the absence or in the presence of overexpressed Tau (Figure 3D).

Thus, we conclude that Tau increases the let-7a activity through DDX6 interaction.

3.4. Tau/DDX6 interaction down regulated myc protein expression.

We next examined whether Tau/DDX6 interaction was required for silencing let-7a targets such as c-myc [37-40]. We first determined the effect of overexpressing Tau on c-myc mRNA levels in SH-SY5Y cells. As shown in Figure 4A, RT-qPCR analyses demonstrated that transient transfection with the Tau expressing vector did not significantly change the level of c-myc mRNA relative to cells transfected with an empty vector. We next examined changes in c-myc protein levels in the same conditions by western-blot (Figure 4B). Quantitative analyses

of these results indicated that the level of c-myc protein was significantly decreased by 30% in Tau overexpressing cells (Figure 4C). Concomitantly, we observed a 45% decrease in DDX6 protein level. Taken together, these results suggest that the reduction in c-myc expression occurred at the translational level. Previously, it was established that 3'-UTR of c-myc mRNA contains the let-7 target sequence [37, 40]. We next investigated whether the effect of Tau on c-myc expression could be recapitulated when the whole 3'UTR of c-myc was present downstream of the luciferase gene. As shown in Figure 4D, we observed 46% repression in the luciferase activity when the c-myc 3'UTR was present. The repression activity was further increased when Tau was overexpressed (by 15% compared to control).

3.5. FTDP-17 Tau mutations decrease its interaction with DDX6 and let-7a activity.

Several exonic mutations in the Tau gene have been identified in familial FTDP-17 such as P301S and P301L [4, 5]. As they are located near one of the DDX6 binding site, we next wondered if these mutations could impact on Tau/DDX6 interaction and consequently, alter let-7a activity. To test this possibility, we first transfected SH-SY5Y cells with a plasmid encoding WT or mutated Tau and firefly luciferase reporter plasmids containing four WT or mutated let-7a binding sites. As shown previously, Tau overexpression decreased the normalized luciferase activity by nearly 70% (Figure 5A). The effect of Tau on let-7a activity was near the control level for P301L and markedly reduced compared to WT (23% repression compared to control cells) for P301S mutations. We next verified whether these two mutations modified the silencing of the let-7a target gene c-myc. For this, SH-SY5Y cells were transfected with plasmids encoding Tau WT, TauP301L and P301S and analyzed 48h later for c-myc expression by western-blot analysis. As shown in Figure 5B and C, overexpressing Tau WT and P301S mutant led to a significant decrease in c-myc expression (nearly 25% decrease). Again, we observed a 45% decrease in DDX6 protein level. Interestingly, overexpression of Tau P301L did not alter the c-myc expression level, in agreement with the results obtained using the let-7a reporter. No change was observed for DDX6. To investigate whether the mutations impeded the interaction between Tau and DDX6, we next realized GST-pulldown experiments using GST-Tau WT, P301L or P301S and *in vitro* translated DDX6. GST pulldown assays revealed that both Tau mutants led to a significant reduction (60% decrease) in DDX6 interaction.

Taken together, these results suggest that FTDP-17 Tau mutations could impact on the interaction with DDX6, leading to the decrease of let-7a activity.

3.6. DDX6 level is increased in human primary and non primary tauopathies brains.

To gain further insights on the relationship between Tau pathology and DDX6 in human brains, we next analyzed Tau and DDX6 cellular localization in neurons from either control non dement (ND) and non primary tauopathy (Braak 6 AD) (Figure 6A) or primary Corticobasal Degeneration (CBD) (Figure 6B) brains by immunofluorescence and confocal microscopy. The level of Tau pathology was monitored using anti-phosphorylated Tau antibodies. As shown in Figure 6, neurons displaying cytoplasmic pathologically phosphorylated Tau were selectively detected in tauopathy brains. Cytoplasmic and nuclear DDX6 labeling was detected in ND brain. The presence of Tau pathology in brains was correlated to a cytoplasmic accumulation of DDX6 mainly colocalized to pathologically phosphorylated Tau indicating that the level of DDX6 is increased in neurons from tauopathy brains. Beside, in AD brain, DDX6 also accumulated in the cytoplasm of some neurons devoided of pathological phosphorylated Tau (Figure 6AB, arrow) suggesting that an increase in DDX6 abundance is an early event in the development of Tau pathology.

4. DISCUSSION

An extensive body of literature has documented the central role of Tau in several neurodegenerative diseases [2]. However, the physiological role of this protein remains incompletely understood. Here, we applied biochemical methodologies to identify novel Tau-associated proteins. We focused our work on the DEAD box RNA helicase DDX6, a protein involved in RNA metabolism and P-body assembly [41]. During this work, another study on the Tau interactome in SH-SY5Y cells reported a Tau/DDX6 interaction [42]. Of interest, the authors further showed that Tau interacted with a large number of proteins involved in translation and RNA metabolism. Possible roles of Tau in these two mechanisms have been suggested for a long time. RNA itself can interact with Tau to favor pathological aggregation [43-45]. Other published studies established a direct interaction of Tau with ribosomes to regulate protein synthesis [46, 47]. Increasing evidences suggest that Tau pathology requires an interaction with some RNA binding proteins such as TIA1 [48, 49]. In response to particular stimuli, these proteins can form reversible aggregate, such as stress granules (SG), to regulate RNA biology and promote cell survival [50]. It has been proposed recently that SG dysfunction could lead to the formation of a nucleation site for aggregation and promote Tau pathology [48, 51]. Interestingly, recent studies suggested that pathological Tau correlated *in vivo* with impaired SG formation in a transgenic model of tauopathy (Shelkovnikova 2017) and Tau regulated physiologically the formation of SG [48, 52]. Contrarily to the Tau/TIA1 interaction, which is mediated by RNA, the interaction described in this study between Tau and DDX6 involves protein/protein interaction, as it is resistant to RNase treatment. Tau deletions and

mutations analysis demonstrated that two domains of Tau were involved, the proline rich and the microtubule domains [53]. Numerous investigations have shown that these two domains participate in the interaction with tubulin and other Tau-associated proteins, producing obvious competition with DDX6.

DDX6 is an important effector of mRNA translational repression/decay and miRNA silencing [41]. Our results suggest that the general mRNA degradation and repression were not regulated by Tau/DDX6 interaction. However, we found a significant effect on let-7a, miR-21 and miR-124 miRNA silencing activities. Depleting DDX6 using siRNA did not alter let-7a activity in SH-SY5Y cells alone but abolished its activation by Tau. These observations are quite different from previous published reports showing that DDX6 depletion partially alleviated miRNA inhibition [29, 30, 54]. However, we could not obtain more than 50% decrease in DDX6 expression, which is maybe not sufficient to affect miRNA activity. Alternatively, miRNA activity in SH-SY5Y cells could be less sensitive to DDX6 levels than in other cell types. Importantly, these results established a direct relationship between Tau and DDX6 in regulating silencing by miRNAs. Post-transcriptional silencing by miRNAs is thought to occur by two distinct mechanisms, first translational repression and second mRNA decay, comprising deadenylation, decapping and 5'-3' decay of mRNA. Using c-myc as target gene of let-7a, we did detect changes in protein levels but not in mRNA abundance. This effect can be recapitulated using the c-myc 3'UTR fused to the luciferase gene excluding a possible increase in c-myc degradation depending of ubiquination [55]. Concomitantly, we observed a decrease in DDX6 protein level. Taniguchi *et al.* demonstrated that DDX6 itself is a target of miRNAs and in particular miR-124. This negative feedback loop would probably tend to attenuate the observed effects afterwards [56]. These results suggest that Tau/DDX6 interaction stimulates the translational repression by miRNAs. This is in agreement with previous studies showing DDX6-dependent changes in mRISC translation suppression independent of mRNA stability [31, 32]. The importance of microtubule network in miRNA translational repression has been suggested for a long time. It has been shown in *c. elegans* that tubulin is involved in target regulation by miRNA [57]. In the same way, the drosophila armitage, a RNA helicase involved in miRNA silencing, is a microtubule associated protein [58].

Our studies with FTDP-17T Tau mutants in neuroblastoma cells and the co-localization of DDX6 with aggregated Tau in various tauopathies suggest an alteration in miRNA functions in these pathologies. Although the two Tau mutants displayed the same decrease in DDX6 binding *in vitro*, they showed different activity using the let-7a sensor and on its target c-myc mRNA. These observations suggested that other cellular process modulate their interaction in the cells, which were not recapitulated *in vitro*. In this regard, we found that Tau WT, P301S

and P301L were differently phosphorylated in neuroblastoma cells (Melissa Gilles, unpublished observations). Of interest, other proteins involved in neurodegenerative diseases can also impact on miRNA biogenesis. For example, the human huntingtin protein interacts with ago2 to regulate miRNAs biogenesis [59]. TDP-43, involved in amyotrophic lateral sclerosis, interacts with dicer and drosha to facilitate the cleavage of pre- and pri-miRNAs respectively [60].

miR-21, miR-124 and Let-7 are expressed in neurons and have been associated with pathological conditions [61]. For example, miR-21 restored the cognitive deficits in APP/PS1 mice and prevented pathologic features [62]. Recent studies demonstrated that miR-124 decreased during AD. Of interest, BACE1, an enzyme involved in A β production, is a direct target of this miRNA [63]. While we observed a clear effect of Tau transient overexpression on c-myc protein levels, early studies on different human tauopathies did not reveal such differences in c-myc expression [64]. However, phosphorylation of c-myc that increased protein stability has been detected in dystrophic neurites and neurons with PHF [65, 66]. These observations do not preclude a transiently increased expression at early stages of the pathology. Interestingly, increased c-myc expression was observed in traumatic brain injury (TBI) and several studies demonstrated the presence of Tau tangles in TBI post-mortem studies [67-69]. In this regard, several models of tauopathies or neurodegenerative diseases have been developed in drosophila or mice based on ectopic c-myc expression [70-72]. Neurodegeneration in this case was attributed in part to cell cycle re-entry of post-mitotic neurons associated with DNA replication and Tau phosphorylation/conformational changes [73]. Moreover, besides c-myc, let-7a is known to regulate other mRNAs, such as ras, dicer, caspase 3 involved in AD disease and miRNA biogenesis, respectively [74-77].

Recent report established a direct correlation between neuronal stem cells differentiation and DDX6/let-7a [78]. The authors demonstrated that DDX6 acted in cooperation with trim32 to increase let-7a activity and neuronal differentiation. Interestingly, Tau deficiency resulted in altered neurogenesis in the hippocampus [79-81]. Based on these observations, it is tempting to speculate that Tau/DDX6 interaction could play a similar role.

In summary, our work demonstrated a new role of Tau in regulating miRNA function. We identified the DEAD box RNA helicase DDX6 as a new partner that acts in cooperation with Tau to increase miRNA activity. Future works dissecting the involvement of Tau in DDX6-mediated gene silencing should provide new insights into Tau pathology.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Diederichs (DKFZ, Heidelberg, Germany) for plasmids. We thank Thomas Rico, Lucie Delattre and Margot Loones for excellent technical assistance. We are grateful to the IMPRT (Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Lille) for access to the confocal microscopy Platform. We express gratitude to Alzheimer's disease patients and their families who allowed us to perform brain autopsies.

FUNDING

This work was supported by the Labex (Excellence Laboratory), DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's Disease), and by INSTALZ, an EU Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research (JPND) project. The project is supported through the following funding organisation under the aegis of JPND - France, Agence Nationale de la Recherche. The project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 643417.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: BL, MCG, LB, DW, MK, FP. Performed the experiments: AC, MG, AS, RC, MC. Analyzed the data: AC, MG, BL, MCG. Discussed the data: AC, MG, EB, DW, MK, LB, MCG, BL. Wrote the manuscript: BL

REFERENCES

- [1] M.D. Weingarten, A.H. Lockwood, S.Y. Hwo, M.W. Kirschner, A protein factor essential for microtubule assembly, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 (1975) 1858-1862.
- [2] T. Lebouvier, F. Pasquier, L. Buee, Update on tauopathies, *Curr Opin Neurol*, 30 (2017) 589-598.
- [3] Y. Wang, E. Mandelkow, Tau in physiology and pathology, *Nat Rev Neurosci*, 17 (2016) 5-21.
- [4] M.G. Spillantini, J.R. Murrell, M. Goedert, M.R. Farlow, A. Klug, B. Ghetti, Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (1998) 7737-7741.
- [5] M. Hutton, C.L. Lendon, P. Rizzu, M. Baker, S. Froelich, H. Houlden, S. Pickering-Brown, S. Chakraverty, A. Isaacs, A. Grover, J. Hackett, J. Adamson, S. Lincoln, D. Dickson, P. Davies, R.C. Petersen, M. Stevens, E. de Graaff, E. Wauters, J. van Baren, M. Hillebrand, M. Joosse, J.M. Kwon, P. Nowotny, L.K. Che, J. Norton, J.C. Morris, L.A. Reed, J. Trojanowski, H. Basun, L. Lannfelt, M. Neystat, S. Fahn, F. Dark, T. Tannenberg, P.R. Dodd, N. Hayward, J.B. Kwok, P.R. Schofield, A. Andreadis, J. Snowden, D. Craufurd, D. Neary, F. Owen, B.A. Oostra, J. Hardy, A. Goate, J. van Swieten, D. Mann, T. Lynch, P. Heutink, Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17, *Nature*, 393 (1998) 702-705.
- [6] D.P. Hanger, J.C. Betts, T.L. Loviny, W.P. Blackstock, B.H. Anderton, New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's

- disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry, *J Neurochem*, 71 (1998) 2465-2476.
- [7] M. Morishima-Kawashima, M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, H. Yoshida, A. Watanabe, K. Titani, Y. Ihara, Hyperphosphorylation of tau in PHF, *Neurobiol Aging*, 16 (1995) 365-371; discussion 371-380.
- [8] L. Buee, L. Troquier, S. Burnouf, K. Belarbi, A. Van der Jeugd, T. Ahmed, F. Fernandez-Gomez, R. Caillierez, M.E. Grosjean, S. Begard, B. Barbot, D. Demeyer, H. Obriot, I. Brion, V. Buee-Scherrer, C.A. Maurage, D. Balschun, R. D'Hooge, M. Hamdane, D. Blum, N. Sergeant, From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death?, *Biochem Soc Trans*, 38 (2010) 967-972.
- [9] G. Lee, R. Thangavel, V.M. Sharma, J.M. Litersky, K. Bhaskar, S.M. Fang, L.H. Do, A. Andreadis, G. Van Hoesen, H. Ksiezak-Reding, Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease, *J Neurosci*, 24 (2004) 2304-2312.
- [10] K. Bhaskar, S.H. Yen, G. Lee, Disease-related modifications in tau affect the interaction between Fyn and Tau, *J Biol Chem*, 280 (2005) 35119-35125.
- [11] K.A. Vossel, K. Zhang, J. Brodbeck, A.C. Daub, P. Sharma, S. Finkbeiner, B. Cui, L. Mucke, Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport, *Science*, 330 (2010) 198.
- [12] M. Morris, A. Koyama, E. Masliah, L. Mucke, Tau reduction does not prevent motor deficits in two mouse models of Parkinson's disease, *PLoS One*, 6 (2011) e29257.
- [13] L.M. Ittner, Y.D. Ke, F. Delerue, M. Bi, A. Gladbach, J. van Eersel, H. Wolfing, B.C. Chieng, M.J. Christie, I.A. Napier, A. Eckert, M. Staufenbiel, E. Hardeman, J. Gotz, Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models, *Cell*, 142 (2010) 387-397.
- [14] Y. Komuro, G. Xu, K. Bhaskar, B.T. Lamb, Human tau expression reduces adult neurogenesis in a mouse model of tauopathy, *Neurobiol Aging*, 36 (2015) 2034-2042.
- [15] L.M. Ittner, J. Gotz, Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease, *Nat Rev Neurosci*, 12 (2011) 65-72.
- [16] N. Zilka, Z. Stozicka, M. Cente, Z. Kazmerova, B. Kovacech, M. Novak, Immunomodulation of memory-impairing protein tau in Alzheimer's disease, *Neurodegener Dis*, 10 (2012) 242-245.
- [17] I. Sotiropoulos, M.C. Galas, J.M. Silva, E. Skoulakis, S. Wegmann, M.B. Maina, D. Blum, C.L. Sayas, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, M.G. Spillantini, N. Sousa, J. Avila, M. Medina, A. Mudher, L. Buee, Atypical, non-standard functions of the microtubule associated Tau protein, *Acta Neuropathol Commun*, 5 (2017) 91.
- [18] A. Sultan, F. Nessler, M. Violet, S. Begard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buee, M.C. Galas, Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection, *J Biol Chem*, 286 (2011) 4566-4575.
- [19] Z. Mansuroglu, H. Benhelli-Mokrani, V. Marcato, A. Sultan, M. Violet, A. Chauderlier, L. Delattre, A. Loyens, S. Talahari, S. Begard, F. Nessler, M. Colin, S. Soues, B. Lefebvre, L. Buee, M.C. Galas, E. Bonnefoy, Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin, *Sci Rep*, 6 (2016) 33047.
- [20] M. Violet, A. Chauderlier, L. Delattre, M. Tardivel, M.S. Chouala, A. Sultan, E. Marciniak, S. Humez, L. Binder, R. Kayed, B. Lefebvre, E. Bonnefoy, L. Buee, M.C. Galas, Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo, *Neurobiol Dis*, 82 (2015) 540-551.
- [21] E. Marciniak, A. Leboucher, E. Caron, T. Ahmed, A. Tailleur, J. Dumont, T. Issad, E. Gerhardt, P. Pagesy, M. Vilen, C. Bournonville, M. Hamdane, K. Bantubungi, S. Lancel, D. Demeyer, S. Eddarkaoui, E. Vallez, D. Vieau, S. Humez, E. Faivre, B. Grenier-Boley, T.F. Outeiro, B. Staels, P. Amouyel, D. Balschun, L. Buee, D. Blum, Tau deletion promotes brain insulin resistance, *J Exp Med*, 214 (2017) 2257-2269.
- [22] Q.L. Ma, X. Zuo, F. Yang, O.J. Ubeda, D.J. Gant, M. Alaverdyan, N.C. Kiose, S. Nazari, P.P. Chen, F. Nothias, P. Chan, E. Teng, S.A. Frautschy, G.M. Cole, Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water Maze with aging, *J Neurosci*, 34 (2014) 7124-7136.

- [23] N. Malmanche, P. Dourlen, M. Gistelink, F. Demiautte, N. Link, C. Dupont, L. Vanden Broeck, E. Werkmeister, P. Amouyel, A. Bongiovanni, H. Bauderlique, D. Moechars, A. Royou, H.J. Bellen, F. Lafont, P. Callaerts, J.C. Lambert, B. Dermaut, Developmental Expression of 4-Repeat-Tau Induces Neuronal Aneuploidy in *Drosophila* Tauopathy Models, *Sci Rep*, 7 (2017) 40764.
- [24] B. Frost, M. Hemberg, J. Lewis, M.B. Feany, Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation, *Nat Neurosci*, 17 (2014) 357-366.
- [25] N. Minshall, M. Kress, D. Weil, N. Standart, Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly, *Mol Biol Cell*, 20 (2009) 2464-2472.
- [26] J.S. Carroll, S.E. Munchel, K. Weis, The DExD/H box ATPase Dhh1 functions in translational repression, mRNA decay, and processing body dynamics, *J Cell Biol*, 194 (2011) 527-537.
- [27] M. Fenger-Gron, C. Fillman, B. Norrild, J. Lykke-Andersen, Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping, *Mol Cell*, 20 (2005) 905-915.
- [28] A. Kamenska, C. Simpson, C. Vindry, H. Broomhead, M. Benard, M. Ernoult-Lange, B.P. Lee, L.W. Harries, D. Weil, N. Standart, The DDX6-4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly, *Nucleic Acids Res*, 44 (2016) 6318-6334.
- [29] C.Y. Chu, T.M. Rana, Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54, *PLoS Biol*, 4 (2006) e210.
- [30] C. Rouya, N. Siddiqui, M. Morita, T.F. Duchaine, M.R. Fabian, N. Sonenberg, Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1, *RNA*, 20 (2014) 1398-1409.
- [31] H. Mathys, J. Basquin, S. Ozgur, M. Czarnocki-Cieciura, F. Bonneau, A. Aartse, A. Dziembowski, M. Nowotny, E. Conti, W. Filipowicz, Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression, *Mol Cell*, 54 (2014) 751-765.
- [32] Y. Chen, A. Boland, D. Kuzuoglu-Ozturk, P. Bawankar, B. Loh, C.T. Chang, O. Weichenrieder, E. Izaurralde, A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing, *Mol Cell*, 54 (2014) 737-750.
- [33] S. Jonas, E. Izaurralde, Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing, *Nat Rev Genet*, 16 (2015) 421-433.
- [34] P. Delobel, S. Flament, M. Hamdane, R. Jakes, A. Rousseau, A. Delacourte, J.P. Vilain, M. Goedert, L. Buee, Functional characterization of FTDP-17 tau gene mutations through their effects on *Xenopus* oocyte maturation, *J Biol Chem*, 277 (2002) 9199-9205.
- [35] B. Lefebvre, Y. Benomar, A. Guedin, A. Langlois, N. Hennuyer, J. Dumont, E. Bouchaert, C. Dacquet, L. Penicaud, L. Casteilla, F. Pattou, A. Ktorza, B. Staels, P. Lefebvre, Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPARgamma in obese mice and humans, *J Clin Invest*, 120 (2010) 1454-1468.
- [36] D. Kuzuoglu-Ozturk, D. Bhandari, E. Huntzinger, M. Fauser, S. Helms, E. Izaurralde, miRISC and the CCR4-NOT complex silence mRNA targets independently of 43S ribosomal scanning, *EMBO J*, 35 (2016) 1186-1203.
- [37] E. Koscianska, V. Baev, K. Skreka, K. Oikonomaki, V. Rusinov, M. Tabler, K. Kalantidis, Prediction and preliminary validation of oncogene regulation by miRNAs, *BMC Mol Biol*, 8 (2007) 79.
- [38] H. Liu, S. Zhang, H. Lin, R. Jia, Z. Chen, Identification of microRNA-RNA interactions using tethered RNAs and streptavidin aptamers, *Biochem Biophys Res Commun*, 422 (2012) 405-410.
- [39] M.J. Gunzburg, A. Sivakumaran, N.R. Pardini, J.H. Yoon, M. Gorospe, M.C. Wilce, J.A. Wilce, Cooperative interplay of let-7 mimic and HuR with MYC RNA, *Cell Cycle*, 14 (2015) 2729-2733.
- [40] H.H. Kim, Y. Kuwano, S. Srikantan, E.K. Lee, J.L. Martindale, M. Gorospe, HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression, *Genes Dev*, 23 (2009) 1743-1748.

- [41] C.F. Bourgeois, F. Mortreux, D. Auboeuf, The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17 (2016) 426-438.
- [42] C.G. Gunawardana, M. Mehrabian, X. Wang, I. Mueller, I.B. Lubambo, J.E. Jonkman, H. Wang, G. Schmitt-Ulms, The Human Tau Interactome: Binding to the Ribonucleoproteome, and Impaired Binding of the Proline-to-Leucine Mutant at Position 301 (P301L) to Chaperones and the Proteasome, *Mol Cell Proteomics*, 14 (2015) 3000-3014.
- [43] T. Kampers, P. Friedhoff, J. Biernat, E.M. Mandelkow, E. Mandelkow, RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments, *FEBS Lett*, 399 (1996) 344-349.
- [44] X. Wang, D. Wang, J. Zhao, M. Qu, X. Zhou, H. He, R. He, The proline-rich domain and the microtubule binding domain of protein tau acting as RNA binding domains, *Protein Pept Lett*, 13 (2006) 679-685.
- [45] X. Zhang, Y. Lin, N.A. Eschmann, H. Zhou, J.N. Rauch, I. Hernandez, E. Guzman, K.S. Kosik, S. Han, RNA stores tau reversibly in complex coacervates, *PLoS Biol*, 15 (2017) e2002183.
- [46] S.C. Papasozomenos, L.I. Binder, Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system, *Cell Motil Cytoskeleton*, 8 (1987) 210-226.
- [47] S. Meier, M. Bell, D.N. Lyons, J. Rodriguez-Rivera, A. Ingram, S.N. Fontaine, E. Mechas, J. Chen, B. Wolozin, H. LeVine, 3rd, H. Zhu, J.F. Abisambra, Pathological Tau Promotes Neuronal Damage by Impairing Ribosomal Function and Decreasing Protein Synthesis, *J Neurosci*, 36 (2016) 1001-1007.
- [48] T. Vanderweyde, D.J. Apicco, K. Youmans-Kidder, P.E.A. Ash, C. Cook, E. Lummertz da Rocha, K. Jansen-West, A.A. Frame, A. Citro, J.D. Leszyk, P. Ivanov, J.F. Abisambra, M. Steffen, H. Li, L. Petrucelli, B. Wolozin, Interaction of tau with the RNA-Binding Protein TIA1 Regulates tau Pathophysiology and Toxicity, *Cell Rep*, 15 (2016) 1455-1466.
- [49] B. Maziuk, H.I. Ballance, B. Wolozin, Dysregulation of RNA Binding Protein Aggregation in Neurodegenerative Disorders, *Front Mol Neurosci*, 10 (2017) 89.
- [50] L. Chen, B. Liu, Relationships between Stress Granules, Oxidative Stress, and Neurodegenerative Diseases, *Oxid Med Cell Longev*, 2017 (2017) 1809592.
- [51] C.A. Brunello, X. Yan, H.J. Huttunen, Internalized Tau sensitizes cells to stress by promoting formation and stability of stress granules, *Sci Rep*, 6 (2016) 30498.
- [52] D.J. Apicco, P.E.A. Ash, B. Maziuk, C. LeBlang, M. Medalla, A. Al Abdullatif, A. Ferragud, E. Botelho, H.I. Ballance, U. Dhawan, S. Boudeau, A.L. Cruz, D. Kashy, A. Wong, L.R. Goldberg, N. Yazdani, C. Zhang, C.Y. Ung, Y. Tripodis, N.M. Kanaan, T. Ikezu, P. Cottone, J. Leszyk, H. Li, J. Luebke, C.D. Bryant, B. Wolozin, Reducing the RNA binding protein TIA1 protects against tau-mediated neurodegeneration in vivo, *Nat Neurosci*, 21 (2018) 72-80.
- [53] J. Avila, J.S. Jimenez, C.L. Sayas, M. Bolos, J.C. Zabala, G. Rivas, F. Hernandez, Tau Structures, *Front Aging Neurosci*, 8 (2016) 262.
- [54] H. Su, S. Meng, Y. Lu, M.I. Trombly, J. Chen, C. Lin, A. Turk, X. Wang, Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing, *Mol Cell*, 43 (2011) 97-109.
- [55] M.A. Gregory, S.R. Hann, c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells, *Mol Cell Biol*, 20 (2000) 2423-2435.
- [56] K. Taniguchi, N. Sugito, M. Kumazaki, H. Shinohara, N. Yamada, N. Matsushashi, M. Futamura, Y. Ito, Y. Otsuki, K. Yoshida, K. Uchiyama, Y. Akao, Positive feedback of DDX6/c-Myc/PTB1 regulated by miR-124 contributes to maintenance of the Warburg effect in colon cancer cells, *Biochim Biophys Acta*, 1852 (2015) 1971-1980.
- [57] D.H. Parry, J. Xu, G. Ruvkun, A whole-genome RNAi Screen for *C. elegans* miRNA pathway genes, *Curr Biol*, 17 (2007) 2013-2022.
- [58] Y. Tomari, T. Du, B. Haley, D.S. Schwarz, R. Bennett, H.A. Cook, B.S. Koppetsch, W.E. Theurkauf, P.D. Zamore, RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant *armitage*, *Cell*, 116 (2004) 831-841.
- [59] J.N. Savas, A. Makusky, S. Ottosen, D. Baillat, F. Then, D. Krainc, R. Shiekhattar, S.P. Markey, N. Tanese, Huntington's disease protein contributes to RNA-mediated gene silencing

through association with Argonaute and P bodies, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (2008) 10820-10825.

[60] Y. Kawahara, A. Mieda-Sato, TDP-43 promotes microRNA biogenesis as a component of the Drosha and Dicer complexes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (2012) 3347-3352.

[61] O.C. Maes, H.M. Chertkow, E. Wang, H.M. Schipper, MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders, *Curr Genomics*, 10 (2009) 154-168.

[62] G.H. Cui, J. Wu, F.F. Mou, W.H. Xie, F.B. Wang, Q.L. Wang, J. Fang, Y.W. Xu, Y.R. Dong, J.R. Liu, H.D. Guo, Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice, *FASEB J*, 32 (2018) 654-668.

[63] F. An, G. Gong, Y. Wang, M. Bian, L. Yu, C. Wei, MiR-124 acts as a target for Alzheimer's disease by regulating BACE1, *Oncotarget*, 8 (2017) 114065-114071.

[64] I. Ferrer, R. Blanco, N-myc and c-myc expression in Alzheimer disease, Huntington disease and Parkinson disease, *Brain Res Mol Brain Res*, 77 (2000) 270-276.

[65] I. Ferrer, R. Blanco, M. Carmona, B. Puig, Phosphorylated c-MYC expression in Alzheimer disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration, *Neuropathol Appl Neurobiol*, 27 (2001) 343-351.

[66] R.C. Sears, The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation, *Cell Cycle*, 3 (2004) 1133-1137.

[67] T. Tokuda, S. Ikeda, N. Yanagisawa, Y. Ihara, G.G. Glenner, Re-examination of ex-boxers' brains using immunohistochemistry with antibodies to amyloid beta-protein and tau protein, *Acta Neuropathol*, 82 (1991) 280-285.

[68] M.L. Schmidt, V. Zhukareva, K.L. Newell, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, Tau isoform profile and phosphorylation state in dementia pugilistica recapitulate Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol*, 101 (2001) 518-524.

[69] S. Di Giovanni, V. Movsesyan, F. Ahmed, I. Cernak, S. Schinelli, B. Stoica, A.I. Faden, Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 8333-8338.

[70] S.I. Chanu, S. Sarkar, Targeted downregulation of dMyc restricts neurofibrillary tangles mediated pathogenesis of human neuronal tauopathies in *Drosophila*, *Biochim Biophys Acta*, 1863 (2017) 2111-2119.

[71] S.I. Chanu, S. Sarkar, Targeted Downregulation of dMyc Suppresses Pathogenesis of Human Neuronal Tauopathies in *Drosophila* by Limiting Heterochromatin Relaxation and Tau Hyperphosphorylation, *Mol Neurobiol*, 54 (2017) 2706-2719.

[72] H.G. Lee, G. Casadesus, A. Nunomura, X. Zhu, R.J. Castellani, S.L. Richardson, G. Perry, D.W. Felsher, R.B. Petersen, M.A. Smith, The neuronal expression of MYC causes a neurodegenerative phenotype in a novel transgenic mouse, *Am J Pathol*, 174 (2009) 891-897.

[73] A. McShea, H.G. Lee, R.B. Petersen, G. Casadesus, I. Vincent, N.J. Linford, J.O. Funk, R.A. Shapiro, M.A. Smith, Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes, *Biochim Biophys Acta*, 1772 (2007) 467-472.

[74] W.P. Tsang, T.T. Kwok, Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3, *Apoptosis*, 13 (2008) 1215-1222.

[75] U. Gartner, M. Holzer, T. Arendt, Elevated expression of p21ras is an early event in Alzheimer's disease and precedes neurofibrillary degeneration, *Neuroscience*, 91 (1999) 1-5.

[76] I. Bussing, F.J. Slack, H. Grosshans, let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer, *Trends Mol Med*, 14 (2008) 400-409.

[77] S. Tokumaru, M. Suzuki, H. Yamada, M. Nagino, T. Takahashi, let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop, *Carcinogenesis*, 29 (2008) 2073-2077.

[78] S. Nicklas, S. Okawa, A.L. Hillje, L. Gonzalez-Cano, A. Del Sol, J.C. Schwamborn, The RNA helicase DDX6 regulates cell-fate specification in neural stem cells via miRNAs, *Nucleic Acids Res*, 43 (2015) 2638-2654.

[79] K. Sennvik, K. Boekhoorn, R. Lasrado, D. Terwel, S. Verhaeghe, H. Korr, C. Schmitz, T. Tomiyama, H. Mori, H. Krugers, M. Joels, G.J. Ramakers, P.J. Lucassen, F. Van Leuven, Tau-4R suppresses proliferation and promotes neuronal differentiation in the hippocampus of tau knockin/knockout mice, *FASEB J*, 21 (2007) 2149-2161.

[80] M. Joseph, M. Anglada-Huguet, K. Paesler, E. Mandelkow, E.M. Mandelkow, Anti-aggregant tau mutant promotes neurogenesis, *Mol Neurodegener*, 12 (2017) 88.

[81] N. Pallas-Bazarra, J. Jurado-Arjona, M. Navarrete, J.A. Esteban, F. Hernandez, J. Avila, M. Llorens-Martin, Novel function of Tau in regulating the effects of external stimuli on adult hippocampal neurogenesis, *EMBO J*, 35 (2016) 1417-1436.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Tau interacts with DDX6.

(A) Whole cell extracts were obtained from SH-SY5Y (SY) or SH-SY5Y cells stably expressing SBP-Tau1N4R (SY-Tau). Cells were lysed and equal amounts of lysates from SH-SY5Y and SH-SY5Y SBP-tau1N4R were mixed with a streptavidin resin. Immunoprecipitates were subjected to immunoblot analysis with antibodies against Tau or DDX6. Representative western-blot results are shown. **(B)** Subcellular fractions were obtained from SH-SY5Y (SY) or SH-SY5Y cells stably expressing SBP-Tau1N4R (SY-Tau). Cells were lysed and equal amounts of lysates from SH-SY5Y and SH-SY5Y SBP-tau1N4R were mixed with a streptavidin resin. Immunoprecipitates were subjected to immunoblot analysis with antibody against DDX6. Representative western-blot results are shown. **(C)** DDX6 or **(D)** Tau4R synthesized by *in vitro* coupled transcription/translation were incubated in the presence of equal amount of GST, GST-Tau2N4R or GST-DDX6. Complexes were precipitated with Sepharose-glutathion beads, resolved by 12% SDS-PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibodies against Tau or DDX6. (*: non specific bands). Representative western-blot results are shown. **(E)** Representative *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) staining showing endogenous Tau-DDX6 interaction in SH-SY5Y cells. (Left : DAPI staining, middle : PLA staining using Tau5 and DDX6 antibodies, right : merge). The scale bar represents 10 μ m. Typical experiments were shown. All experiments were carried out in triplicate.

Figure 2. Characterization of Tau and DDX6 interaction.

(A) Schematic representation of the different GST-Tau2N4R fusion proteins. **(B)** DDX6 synthesized by *in vitro* coupled transcription/translation was incubated in the presence of GST, GST-2N (1-152), GST-PxxP (153-243), GST-4R (244-441) fusion proteins. Immunoprecipitates were subjected to immunoblot analysis with antibodies against DDX6. **(C)** Characterization of Tau(PxxP)-DDX6 interaction. DDX6 synthesized by *in vitro* coupled transcription/translation was incubated in the presence of different GST-Tau PxxP deletion mutants and analyzed as described in (B). **(D)** Characterization of Tau 4R-DDX6 interaction using different Tau4R deletion mutants and analyzed by GST pulldown. **(E)** Effect of Tau PxxP point mutations on the interaction with DDX6. The

GST pulldown assay was realized as described in (B). Results are expressed as arbitrary scanning units. **(F)** Effect of Tau4R point mutations on the interaction with DDX6 and analyzed by GST-pulldown. **(G)** Effect of mutations on the interaction of Tau full length (FL) with DDX6 and analyzed by GST-pulldown. **(H)** myc-tagged DDX6 and DDX6 deletion mutants synthesized by *in vitro* coupled transcription/translation were incubated in the presence of GST or GST-Tau fusion proteins. Immunoprecipitates were subjected to immunoblot analysis with an antibody against myc-tag. Representative western-blot results are shown. All experiments were carried out in triplicate and Sd never exceeded 0.15.

Figure 3. Tau regulates micro RNA let-7a, miR-21 and miR-124 activity.

(A) Diagram showing the normalized activity of let-7a, miR-21 and miR-124 luciferase sensors in the absence or presence of overexpressed Tau1N4R in SH-SY5Y cells. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=3). *** p<0.001. **(B)** Western blotting indicating the DDX6 knockdown efficiency. Representative western-blot results are shown. **(C)** DDX6 inhibition abolished the effect of Tau on let-7a activity. Diagram showing the normalized activity of Let-7a luciferase sensors coexpressed with si-scramble or si-DDX6 and Tau1N4R in SH-SY5Y cells. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=3). *, p<0.05; **, p<0.01. **(D)** Tau overexpression did not modify let-7a, miR-21 and miR-124 expression levels. qPCR analysis of the mature let-7a, miR-21 and miR-124 in SH-SY5Y cells overexpressing or not Tau1N4R. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=3).

Figure 4. The inhibition effect of Tau on c-myc expression requires let-7a.

(A) RT-qPCR analysis indicated that Tau1N4R over-expression (48h) did not modify the level of c-myc expression in SH-SY5Y cells. All experiments were carried out in triplicate, and Sd never exceeded 0.002. **(B)** Transfection of Tau downregulated the expression of c-myc at the protein level in SH-SY5Y cells. The level of c-myc, DDX6 and Tau were analyzed by western-blot analysis 48h after transfection. Actin is used as internal control. Representative western-blot results are shown. **(C)** Quantification of c-myc expression level obtained in (B). Data are expressed as the mean \pm SEM (n=3). * p<0.05 **(D)** Effect of Tau overexpression on the luciferase activity of the reporter gene with c-myc 3'UTR-luciferase construct. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=3). ** p<0.01.

Figure 5. Effect of pathological mutations of Tau P301S and P301L on let-7a activity.

(A) Diagram showing the normalized activity of let-7a luciferase sensors co-transfected with Tau1N4R WT, Tau1N4R P301S or Tau1N4R P301L in SH-SY5Y cells. Data are expressed as

the mean±SEM (n=3). *, p<0.05; **, p<0.01 ; ***p<0.001 **(B)** Western blot analysis of c-myc, DDX6 and Tau protein expression following transfection of Tau1N4R WT, Tau1N4R P301S or Tau1N4R P301L in SH-SY5Y cells. Actin is used as internal control. Representative western-blot results are shown. (*: non specific bands). **(C)** Quantification of c-myc expression level obtained in (B). Data are expressed as the mean±SEM (n=3). ** p<0.01, *** p<0.001 **(D)** P301L and P301S decrease the affinity of Tau for DDX6. DDX6 synthesized by *in vitro* coupled transcription/translation were incubated in the presence of GST, GST-Tau2N4R, GST-Tau2N4R P301L or GST-Tau2N4R P301S. Complexes were precipitated with Sepharose-glutathion beads, resolved by 12% SDS PAGE and visualized by immunoblot analysis with antibodies against DDX6. Representative western-blot results are shown. All experiments were carried out in triplicate and Sd never exceeded 0.15.

Figure 6: DDX6 level is increased in human primary and non primary tauopathies brains. Representative images of human brain sections from control non dement (ND) and tauopathy (AD, CBD) patients, co-labeled with anti-DDX6 and phosphorylated Tau antibodies AT100 **(A)** and AT8 **(B)**, and analyzed by confocale microscopy. White arrows indicate DDX6 accumulation in cells devoided of cytoplasmic Tau pathological phosphorylation. The nuclei were detected with DAPI staining. Cytoplasmic DDX6 increase correlates with Tau pathological phosphorylation.

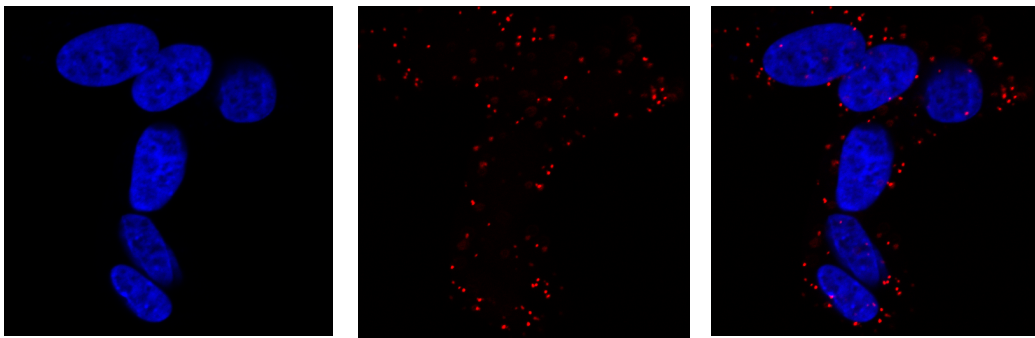
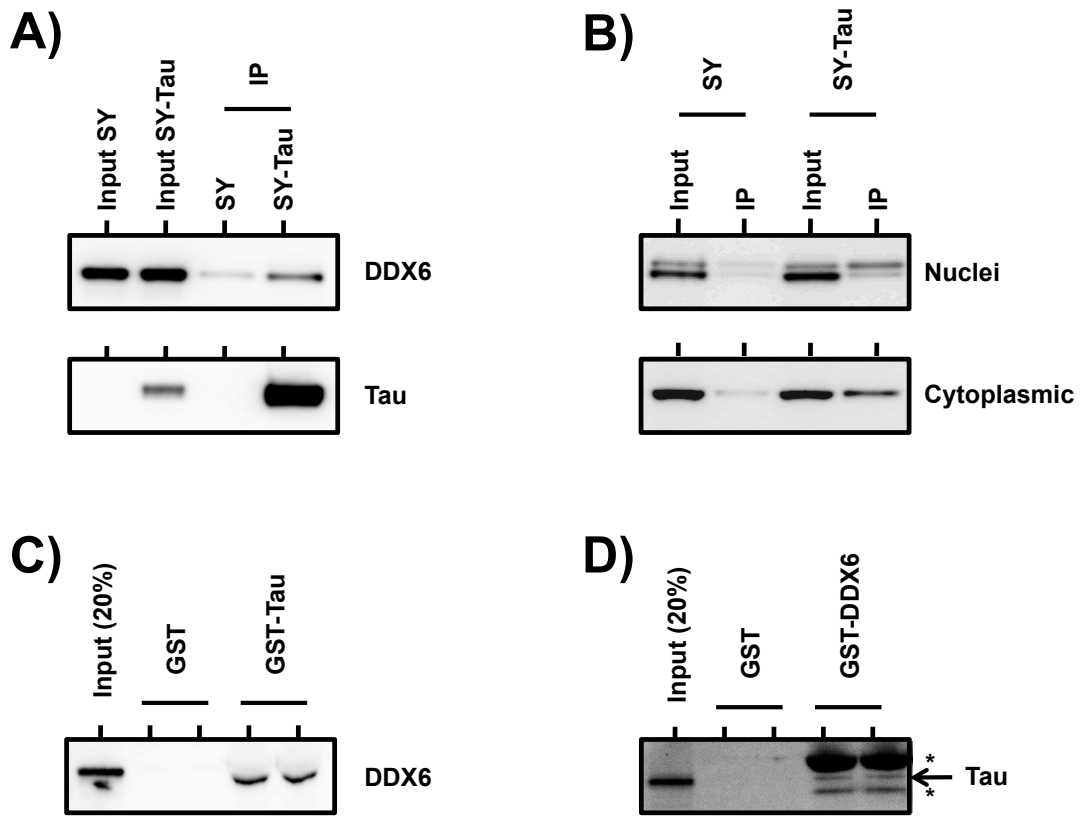


FIGURE 1

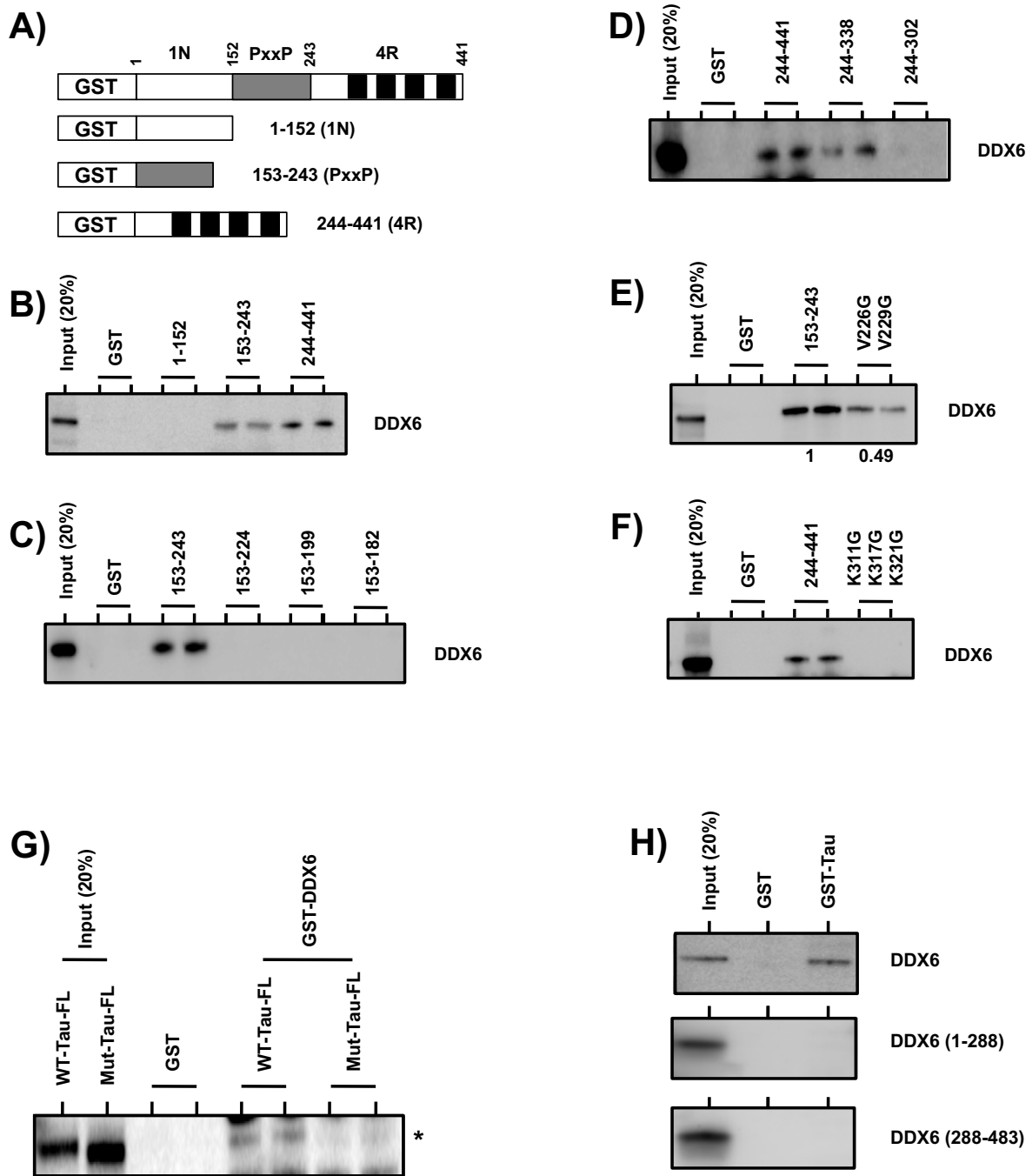


FIGURE 2

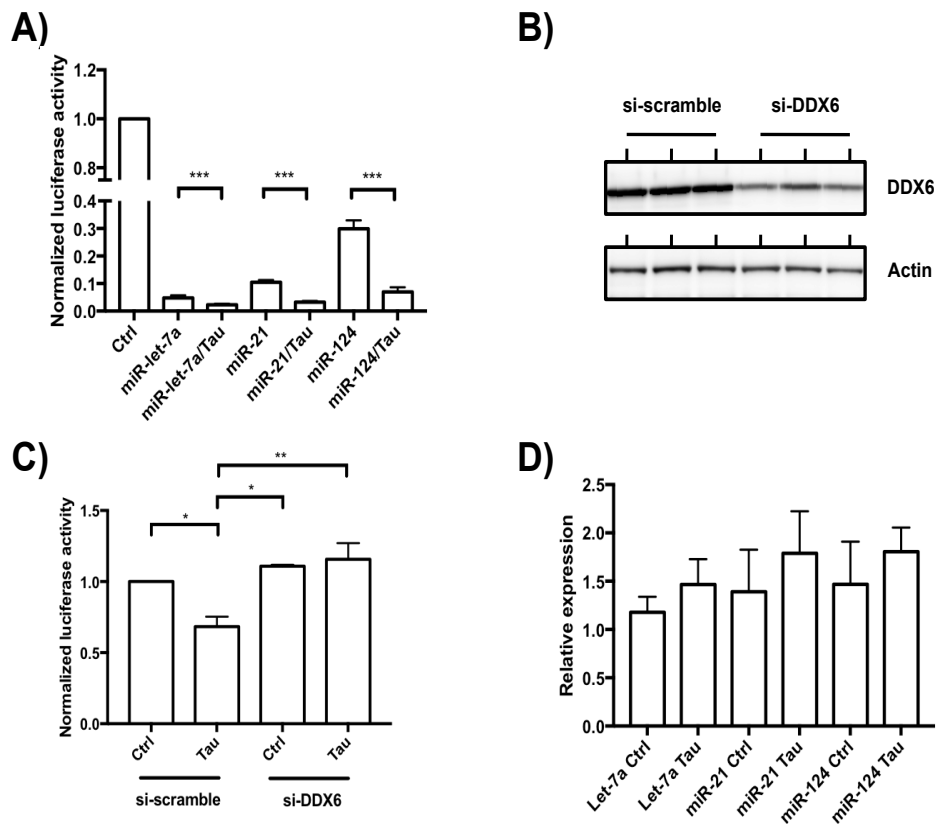


FIGURE 3

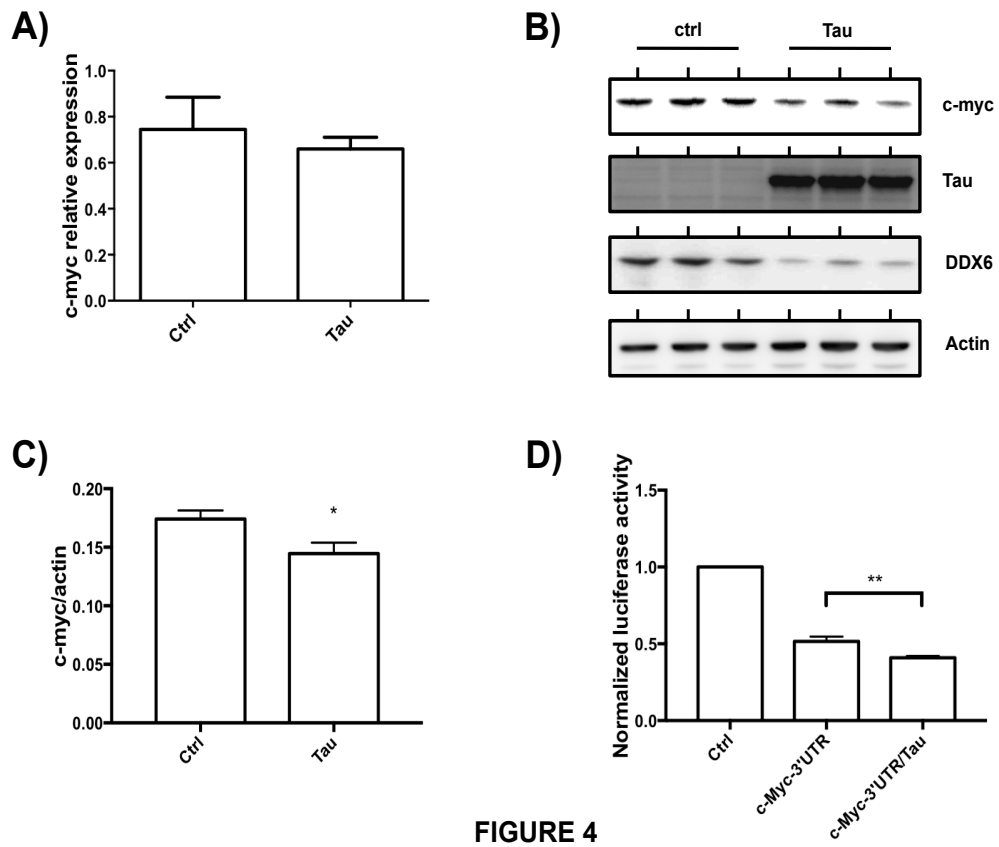
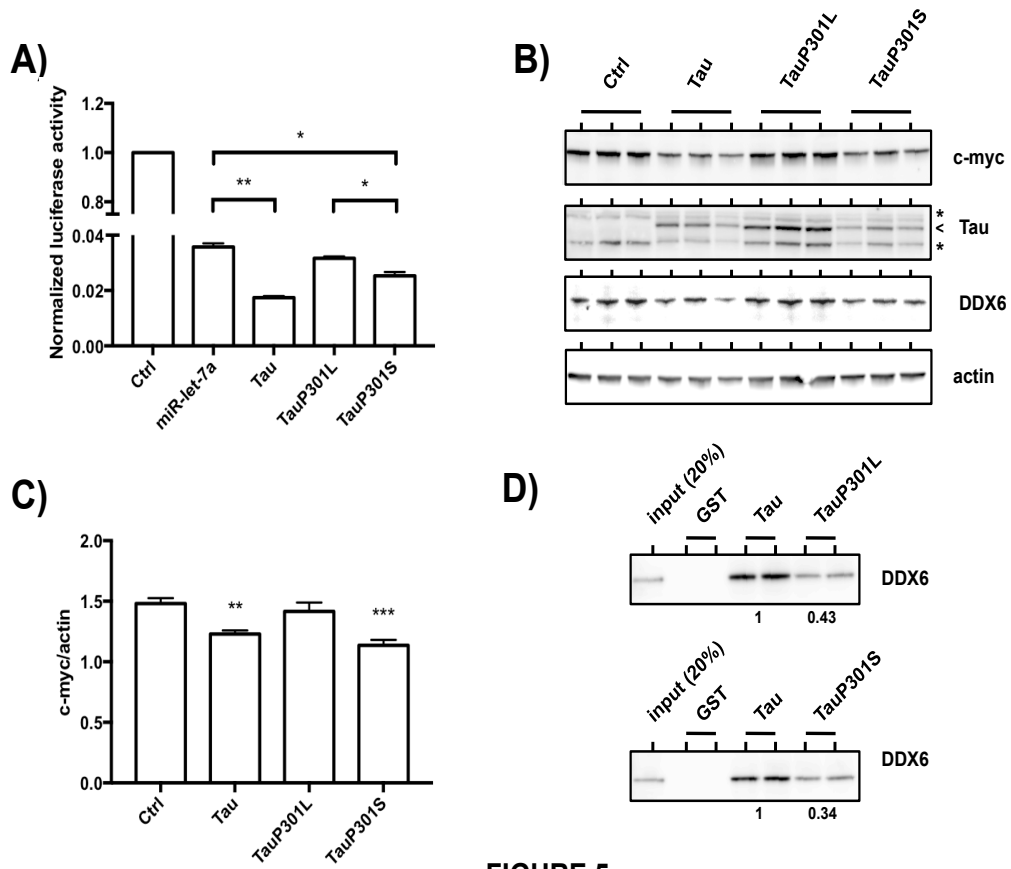


FIGURE 4



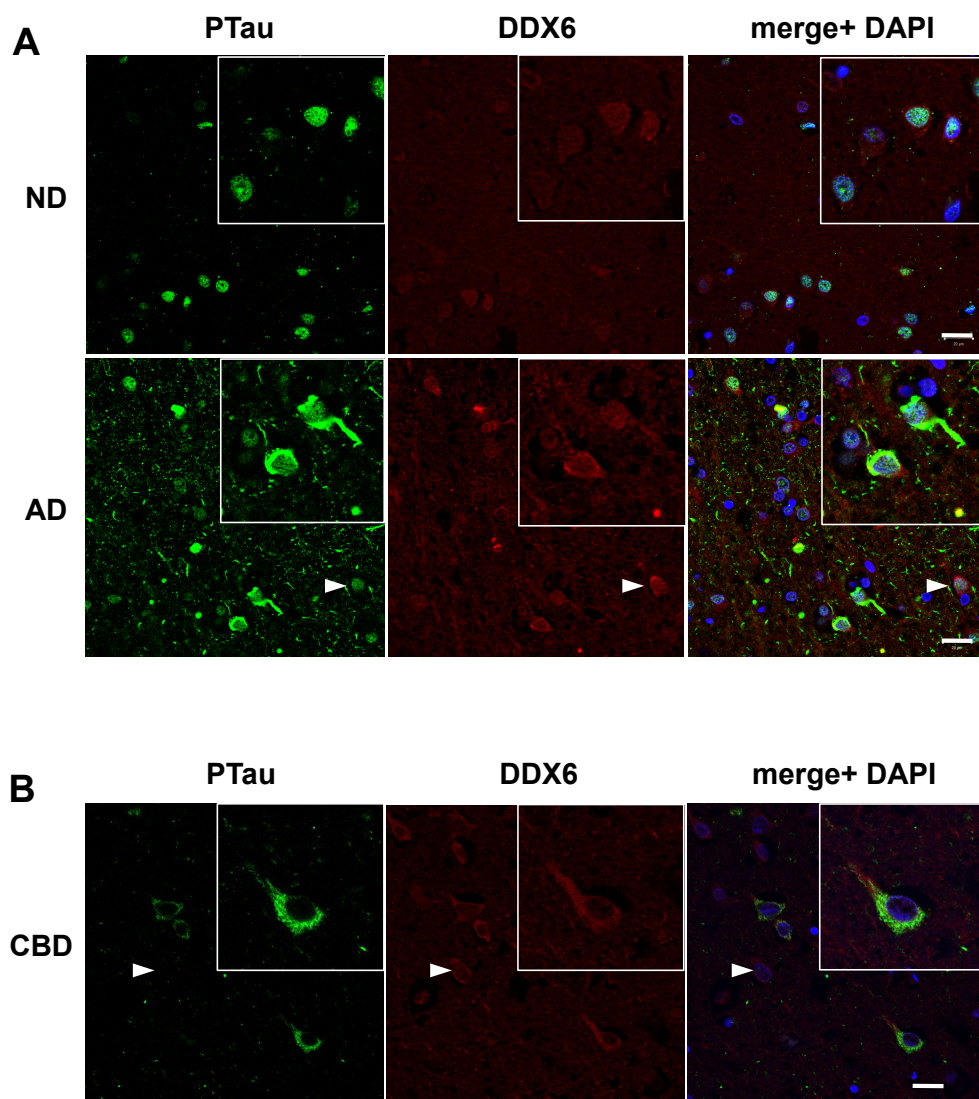
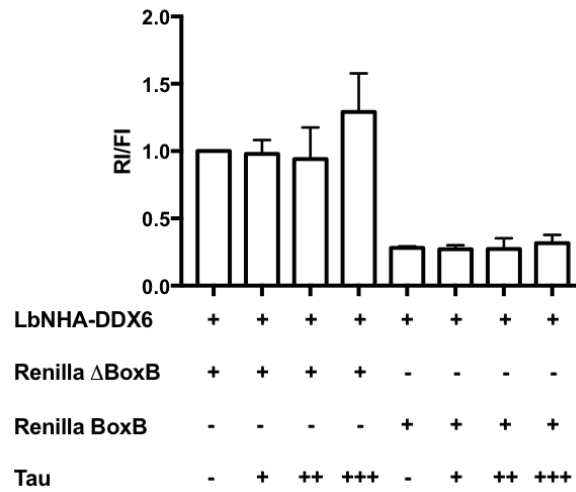


FIGURE 6



Supplementary Figure 1: Tau did not regulate the general translational repression mediated by DDX6. SH-SY5Y cells were co-transfected with LbNHA-DDX6 encoding plasmid and Renilla luciferase Δ BoxB or Renilla luciferase BoxB plasmid. Increasing quantities of Tau4R. Firefly luciferase construct was co-transfected and used as an internal control to normalize the values of renilla reporter activity. Data are expressed as the mean \pm SEM (n=3).

III. Discussion

Les résultats de cette étude ont permis de confirmer l'interaction entre Tau et DDX6 *in vitro* et *in cellulo*. Des analyses par GST-pulldown ont révélé que Tau interagit avec DDX6 par l'intermédiaire de son domaine de liaison aux microtubules et de son domaine riche en proline. De façon intéressante, les acides aminés du domaine riche en proline impliqués dans l'interaction sont différents de ceux identifiés pour DDX5. J'ai également participé à la caractérisation des domaines d'interaction de DDX6 avec Tau et mis en évidence que les deux domaines hélicases de DDX6 sont nécessaires pour interagir avec Tau. Concernant l'étude fonctionnelle du complexe, j'ai contribué à la mise en évidence du rôle de Tau dans la régulation de l'activité des micro ARN let-7a, mir-21 et mir-124. Nous avons aussi démontré que l'expression de c-myc, une cible connue du micro ARN let-7a, est régulée par Tau suite à l'activation du micro ARN. Les micro ARN régulés par Tau sont exprimés dans les neurones et sont associés aux maladies neurodégénératives. Par exemple, l'expression des micro ARN 124 est diminuée dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, ce micro ARN régule l'expression de BACE1, une enzyme impliquée dans la synthèse des peptides A β à l'origine des plaques amyloïdes (An *et al.*, 2017). Par ailleurs, l'injection intra-hippocampale de lentivirus codant pour le micro ARN 21 chez des souris transgéniques mimant la pathologie Alzheimer permet de restaurer leurs capacités cognitives (Cui *et al.*, 2018). Plus récemment, des études menées à partir de liquide céphalorachidien de patients atteints de la maladie d'Alzheimer révèlent une augmentation du nombre de copies de micro ARN let-7b et let-7e comparé aux sujets sains tandis que le nombre de copies let-7a reste stable (Derkow *et al.*, 2018).

Les mutations P301S et P301L, associées aux formes familiales des tauopathies, induisent des dysfonctionnements du complexe Tau-DDX6. Les deux mutations diminuent l'interaction entre Tau et DDX6 *in vitro* et altèrent l'effet de Tau dans l'activité des micro ARN let-7a. Toutefois, des différences d'activité du micro ARN sont observées selon l'expression du mutant P301S ou P301L. En effet, le mutant P301L abolit totalement l'effet de Tau dans la régulation de l'activité de let-7a tandis qu'une activité résiduelle persiste en présence du mutant P301S. Ces résultats nous permettent de supposer que des événements se produisant au sein des cellules pourraient moduler l'interaction entre les deux protéines et, de ce fait, réguler l'effet de

Tau sur l'activité des micro ARN. D'ailleurs, au cours de ma thèse nous avons obtenus des résultats appuyant cette hypothèse. En effet, des analyses par immunofluorescence à partir de cellules HeLa ont révélé que les mutants P301S et P301L présentent des différences de phosphorylation, une modification post-traductionnelle connue pour réguler l'interaction des protéines Tau avec leurs partenaires (Buée *et al.*, 2000; Avila, 2009).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude apporte de nouvelles connaissances concernant les fonctions physiologiques régulées par les protéines Tau.

Tau s'avère ne pas être une simple MAP (*microtubule associated protein*) mais une protéine pléiotropique impliquée dans différentes fonctions selon sa localisation cellulaire telles que le transport axonal, la transduction du signal, la plasticité synaptique... De récentes études ont mis en évidence la présence de Tau au niveau nucléaire élargissant l'éventail des fonctions contrôlées par cette protéine (rôle dans la protection des acides nucléiques et dans l'intégrité de l'hétérochromatine péricentromérique...). Ce projet de thèse a permis de mettre en lumière de nouvelles fonctions régulées par Tau en lui attribuant un rôle dans le métabolisme des ARN grâce notamment à son interaction avec différentes protéines impliquées dans ces mécanismes. Nous avons mis en évidence que Tau joue un rôle dans la régulation de l'épissage et la dégradation des ARNm par la voie NMD. Nous avons également identifié l'ARN hélicase à boîte DEAD DDX5 comme nouveau partenaire protéique de Tau et comme co-régulateur de l'activité de cette dernière. Une étude effectuée en parallèle de ce projet, nous a permis de démontrer que Tau interagit aussi avec DDX6, une autre ARN hélicase à boîte DEAD, lui conférant un rôle dans la régulation de l'activité de plusieurs micro ARN.

Cette étude suggère de nouveaux mécanismes à l'origine du développement des tauopathies

Les protéines Tau sont impliquées dans le développement des maladies neurodégénératives appelées tauopathies. De nombreuses recherches ont été effectuées afin de comprendre par quels mécanismes les protéines Tau induisent des dysfonctionnements de l'activité cellulaire aboutissant à la dégénérescence neuronale. Ces études ont mis en évidence une phosphorylation exacerbée des protéines Tau en condition pathologique associée à une relocalisation cellulaire et à l'altération de nombreux mécanismes neuronaux. Parmi ces mécanismes, on retrouve des dysfonctionnements de l'activité synaptique, des voies de signalisations, des troubles de la neurogénèse et du métabolisme des ARN. Nos résultats révèlent une co-localisation entre les protéines Tau pathologiques (hyperphosphorylées) et les hélicases DDX5 et DDX6 dans plusieurs tauopathies. De plus, nous avons mis en

évidence l'implication des mutations P301S et P301L, associées au développement des FTDP-17, dans la régulation des mécanismes contrôlés par Tau à savoir la voie NMD et l'activité des micro ARN. Par ailleurs, le niveau de phosphorylation du résidu Thr231, un site phosphorylé dans les tauopathies, module la régulation de Tau sur la voie NMD. L'ensemble de nos résultats renforce l'idée d'une dérégulation du métabolisme des ARN lors de la mise en place des tauopathies et permettent d'approfondir les connaissances préexistantes concernant les mécanismes moléculaires à l'origine du dysfonctionnement cellulaire observé dans ces pathologies.

BIBLIOGRAPHIE

A

Albers, D. S. *et al.* (2002) 'Evidence for Oxidative Stress in the Subthalamic Nucleus in Progressive Supranuclear Palsy', *Journal of Neurochemistry*, 73(2), pp. 881–884. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0730881.x.

Allen, B. *et al.* (2002) 'Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), pp. 9340–9351. doi: 22/21/9340 [pii].

Alonso, A. C. *et al.* (1994) 'Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), pp. 5562–6. doi: 10.1073/pnas.91.12.5562.

Alonso, A. C., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1996) 'Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules.', *Nature medicine*, 2(7), pp. 783–7. doi: 10.1038/nm0796-783.

Alonso, A. D. *et al.* (1997) 'Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), pp. 298–303. doi: 10.1073/pnas.94.1.298.

Alonso, A. D. C. *et al.* (2004) 'Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations', *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), pp. 34873–34881. doi: 10.1074/jbc.M405131200.

Alonso, A. del C. *et al.* (2001) 'Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Shraight Filaments', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), pp. 6923–6928. doi: 10.1073/pnas.121119298.

Alzheimer, A. *et al.* (1995) 'An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde".', *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, 8(6), pp. 429–31. doi: 10.1002/ca.980080612.

An, F. *et al.* (2017) 'MiR-124 acts as a target for Alzheimer's disease by regulating BACE1', *Oncotarget*, 8(69), pp. 114065–114071. doi: 10.18632/oncotarget.23119.

Andersen, C. B. F. *et al.* (2006) 'Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-Box ATPase bound to RNA', *Science*, 313(5795), pp. 1968–1972. doi: 10.1126/science.1131981.

Andreadis, A. (2005) 'Tau gene alternative splicing: Expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), pp. 91–103. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.08.010.

Andreadis, A., Brown, W. M. and Kosik, K. S. (1992) 'Structure and novel exons of the human .tau. gene', *Biochemistry*, 31(43), pp. 10626–10633. doi: 10.1021/bi00158a027.

Apicco, D. J. *et al.* (2017) 'Against Tau-Mediated Neurodegeneration in Vivo', 21(January). doi: 10.1038/s41593-017-0022-z.

Apicco, D. J. *et al.* (2018) 'Reducing the RNA binding protein TIA1 protects against tau-mediated neurodegeneration in vivo.', *Nature neuroscience*, 21(1), pp. 72–80. doi: 10.1038/s41593-017-0022-z.

Arai, T. *et al.* (2006) 'TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(3), pp. 602–611. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.093.

Arriagada, P. V. *et al.* (1992) 'Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease', *Neurology*, 42(3), pp. 631–631. doi: 10.1212/WNL.42.3.631.

Ash, P. E. A. *et al.* (2014) 'Pathological stress granules in Alzheimer's disease', *Brain Research*. Elsevier, 1584, pp. 52–58. doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.052.

Avila, J. (2009) 'The tau code', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 1(JUL), pp. 1–5. doi: 10.3389/neuro.24.001.2009.

B

Bai, B. *et al.* (2013) 'U1 small nuclear ribonucleoprotein complex and RNA splicing alterations in Alzheimer's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(41), pp. 16562–16567. doi: 10.1073/pnas.1310249110/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1310249110.

Bai, B. (2018) 'U1 snRNP alteration and neuronal cell cycle reentry in Alzheimer disease', *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(MAR), pp. 1–10. doi: 10.3389/fnagi.2018.00075.

Baker, M. *et al.* (1999) 'Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy', *Human Molecular Genetics*, 8(4), pp. 711–715. doi: 10.1093/hmg/8.4.711.

Bancher, C. *et al.* (1989) 'Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease', *Brain Research*, 477(1–2), pp. 90–99. doi: 10.1016/0006-8993(89)91396-6.

Barash, Y. *et al.* (2010) 'Deciphering the splicing code', *Nature*, 465(7294), pp. 53–59. doi: 10.1038/nature09000.

Barbosa, C., Peixeiro, I. and Romão, L. (2013) 'Gene Expression Regulation by Upstream Open Reading Frames and Human Disease', *PLoS Genetics*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1003529.

Barmada, S. J. *et al.* (2015) 'Amelioration of toxicity in neuronal models of amyotrophic lateral sclerosis by hUPF1', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(25), pp. 7821–7826. doi: 10.1073/pnas.1509744112.

Barreda, E. G. de and Avila, J. (2011) 'Tau regulates the subcellular localization of calmodulin', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(3), pp. 500–504. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.082.

Barzilai, A., Biton, S. and Shiloh, Y. (2008) 'The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance', *DNA Repair*, 7(7), pp. 1010–1027. doi: 10.1016/j.dnarep.2008.03.005.

Bates, G. J. *et al.* (2005) 'The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor', *The EMBO Journal*, 24(3), pp. 543–553. doi: 10.1038/sj.emboj.7600550.

Baudiers, J. and Cole, R. D. (1988) 'SIOOb Regulate 7 Phosphorylation by the Ca²⁺ / Calmodulin-dependent Protein Kinase 11"', *Biological Chemistry*, 263, pp. 5876–5883.

Baumann, K. *et al.* (1993) 'Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5', *FEBS Letters*, 336(3), pp. 417–424. doi: 10.1016/0014-5793(93)80849-P.

Behm-Ansmant, I. *et al.* (2007) 'mRNA quality control: An ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons', *FEBS Letters*, 581(15), pp. 2845–2853. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.027.

Belew, A. T. *et al.* (2014) 'Ribosomal frameshifting in the CCR5 mRNA is regulated by miRNAs and the NMD pathway', *Nature*. Nature Publishing Group, 512(7514), pp. 265–269. doi: 10.1038/nature13429.

Belew, A. T., Advani, V. M. and Dinman, J. D. (2011) 'Endogenous ribosomal frameshift signals operate as mRNA destabilizing elements through at least two molecular pathways in yeast', *Nucleic Acids Research*, 39(7), pp. 2799–2808. doi: 10.1093/nar/gkq1220.

Benncib, M. *et al.* (2000) 'Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain', *FEBS Letters*, 485(1), pp. 87–93. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02203-1.

von Bergen, M. *et al.* (2000) 'Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif (306VQIVYK311) forming beta structure', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), pp. 5129–5134. doi: 10.1073/pnas.97.10.5129.

Von Bergen, M. *et al.* (2001) 'Mutations of Tau Protein in Frontotemporal Dementia Promote Aggregation of Paired Helical Filaments by Enhancing Local β -Structure', *Journal of Biological Chemistry*, 276(51), pp. 48165–48174. doi: 10.1074/jbc.M105196200.

Berriman, J. *et al.* (2003) 'Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross- structure', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), pp. 9034–9038. doi: 10.1073/pnas.1530287100.

Bharadwaj, P. R. *et al.* (2009) 'Guest Editor : B . O . Popescu A β aggregation and possible implications in Alzheimer ' s disease pathogenesis Amyloid structure Mechanism of amyloid aggregation', 13(3), pp. 412–421. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00609.x.

Biernat, J. *et al.* (1993) 'Phosphorylation of Ser262strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding', *Neuron*, 11(1), pp. 153–163. doi: 10.1016/0896-6273(93)90279-Z.

Blessed, G., Tomlinson, B. E. and Roth, M. (1968) 'The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects.', *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 114(512), pp. 797–811. doi: 10.1192/bjp.114.512.797.

Boelz, S. *et al.* (2006) 'A chemiluminescence-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(1), pp. 186–191. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.08.017.

DE BONI, U. and CRAPPER, D. R. (1978) 'Paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured neurones', *Nature*, 271(5645), pp. 566–568. doi: 10.1038/271566a0.

Bou Samra, E. *et al.* (2017) 'A role for Tau protein in maintaining ribosomal DNA stability and cytidine deaminase-deficient cell survival', *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-00633-1.

Bourgeois, C. F. *et al.* (1999) 'Identification of a bidirectional splicing enhancer: Differential involvement of SR proteins in 5 ' or 3 ' splice site activation', *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), pp. 7347–7356. doi: 10.1128/MCB.19.11.7347.

Boutajangout, A. *et al.* (2004) 'Expression of tau mRNA and soluble tau isoforms in affected and non-affected brain areas in Alzheimer's disease', *FEBS Letters*, 576(1–2), pp. 183–189. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.011.

Boutz, P. L. *et al.* (2007) 'A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons', *Genes and Development*, 21(13), pp. 1636–1652. doi: 10.1101/gad.1558107.

Braak, F., Braak, H. and Mandelkow, E. M. (1994) 'A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads', *Acta Neuropathologica*, 87(6), pp. 554–567. doi: 10.1007/BF00293315.

Braak, H. and Braak, E. (1991) 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathologica*, 82(4), pp. 239–259. doi: 10.1007/BF00308809.

Breuzard, G. *et al.* (2013) 'Molecular mechanisms of Tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells', *Journal of Cell Science*, 126(13), pp. 2810–2819. doi: 10.1242/jcs.120832.

Brion, J., Couck, A. M. and Dumnd, F. (1985) 'Neurofibrillary tangles of Alzheimer ' s disease : An immunohistochemical study Neurofibrillary tangles of Alzheimer ' s disease : an immunohistochemical studv', *J. Submicrosc. Cytol.*, (September).

Brook, J. D. *et al.* (1992) 'Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member', *Cell*, 68(4), pp. 799–808. doi: 10.1016/0092-8674(92)90154-5.

Bruno, I. G. *et al.* (2011) 'Identification of a MicroRNA that Activates Gene Expression by Repressing Nonsense-Mediated RNA Decay', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 42(4), pp. 500–510. doi: 10.1016/j.molcel.2011.04.018.

Bryan, J. B., Nagle, B. W. and Doenges, K. H. (1975) 'Inhibition of tubulin assembly by RNA and other polyanions: evidence for a required protein.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), pp. 3570–4. doi: 10.1073/pnas.72.9.3570.

Buée, L. *et al.* (2000) 'Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders11These authors contributed equally to this work.', *Brain Research Reviews*, 33(1), pp. 95–130. doi: 10.1016/S0165-0173(00)00019-9.

Buée, L. and Delacourte, A. (2006) '[Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process].', *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement*, 4(4), pp. 261–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17194646>.

Bugiani, O. *et al.* (1999) 'Frontotemporal dementia and corticobasal degeneration in a family with a P301S mutation in tau.', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 58(6), pp. 667–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10374757>.

C

Caceres, A. and Kosik, K. S. (1990) 'Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons', *Nature*, 343(6257), pp. 461–463. doi: 10.1038/343461a0.

Caillet-Boudin, M. L. *et al.* (2015) 'Regulation of human MAPT gene expression', *Molecular Neurodegeneration*. Molecular Neurodegeneration, 10(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s13024-015-0025-8.

De Calignon, A. *et al.* (2010) 'Caspase activation precedes and leads to tangles', *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7292), pp. 1201–1204. doi: 10.1038/nature08890.

- Camats, M. *et al.* (2008) 'P68 RNA helicase (DDXS) alters activity of Cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras', *PLoS ONE*, 3(8), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0002926.
- Caretti, G. *et al.* (2006) 'The RNA Helicases p68/p72 and the Noncoding RNA SRA Are Coregulators of MyoD and Skeletal Muscle Differentiation', *Developmental Cell*, 11(4), pp. 547–560. doi: 10.1016/j.devcel.2006.08.003.
- Carter, M. S. *et al.* (1995) 'a Regulatory Mechanism That Detects Premature Nonsense Codons in T-Cell Receptor Transcripts in-Vivo Is Reversed By Protein-Synthesis Inhibitors in-Vitro', *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), pp. 28995–29003.
- Chang, E. *et al.* (2008) 'Pathogenic missense MAPT mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps', *Journal of Neurochemistry*, 107(4), pp. 1113–1123. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05692.x.
- Chen, N. N. *et al.* (2012) 'Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats', *Journal of Alzheimer's Disease*, 30(3), pp. 585–594. doi: 10.3233/JAD-2012-111946.
- Chen, Q. *et al.* (2012) 'Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF', *Neurochemistry International*, 60(3), pp. 233–242. doi: 10.1016/j.neuint.2011.12.013.
- Cheng, J., Fogel-Petrovic, M. and Maquat, L. E. (1990) 'Translation to near the distal end of the penultimate exon is required for normal levels of spliced triosephosphate isomerase mRNA.', *Molecular and Cellular Biology*, 10(10), pp. 5215–25. doi: 10.1128/MCB.10.10.5215.
- Chiu, S.-Y. *et al.* (2003) 'Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1.', *RNA (New York, N.Y.)*, 9(1), pp. 77–87. Available at: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.2137903>.
- Chiu, S. L., Chen, C. M. and Cline, H. T. (2008) 'Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function In Vivo', *Neuron*, 58(5), pp. 708–719. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.014.
- Cho, J. H. and Johnson, G. V. W. (2003) 'Glycogen synthase kinase 3 β phosphorylates tau at both primed and unprimed sites: Differential impact on microtubule binding', *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), pp. 187–193. doi: 10.1074/jbc.M206236200.
- Cho, J. and Johnson, G. V. W. (2004) 'Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3b (GSK3b) plays a critical role in regulating tau ' s ability to bind and stabilize microtubules', *The Journal of neuroscience*, 88, pp. 349–358. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02155.x.

Clark, E. L. *et al.* (2008) 'Coupling transcription to RNA processing via the p68 DEAD box RNA helicase androgen receptor co-activator in prostate cancer', *Biochemical Society Transactions*, 36(3), pp. 546–547. doi: 10.1042/BST0360546.

Clavaguera, F. *et al.* (2009) 'Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain', *Nature Cell Biology*, 11(7), pp. 909–913. doi: 10.1038/ncb1901.

Cohen, T. J. *et al.* (2011) 'The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation', *Nature Communications*, 2, p. 252. doi: 10.1038/ncomms1255.

Cohen, T. J. *et al.* (2013) 'The microtubule-associated tau protein has intrinsic acetyltransferase activity', *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(6), pp. 756–762. doi: 10.1038/nsmb.2555.

Colombo, M. *et al.* (2017) 'Transcriptome-wide identification of NMD-targeted human mRNAs reveals extensive redundancy between SMG6- and SMG7-mediated degradation pathways', *RNA*, 23(2). doi: 10.1261/rna.059055.116.

Cook, C., Stankowski, J. N., *et al.* (2014) 'Acetylation: A new key to unlock tau's role in neurodegeneration', *Alzheimer's Research and Therapy*, 6(3), pp. 4–11. doi: 10.1186/alzrt259.

Cook, C., Carlomagno, Y., *et al.* (2014) 'Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance', *Human Molecular Genetics*, 23(1), pp. 104–116. doi: 10.1093/hmg/ddt402.

Cordin, O. *et al.* (2006) 'The DEAD-box protein family of RNA helicases', *Gene*, 367(1–2), pp. 17–37. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.019.

Corpet, F. (1988) 'Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.', *Nucleic acids research*, 16(22), pp. 10881–90. doi: 10.1093/nar/gkn907.

Le Corre, S. *et al.* (2006) 'An inhibitor of tau hyperphosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), pp. 9673–8. doi: 10.1073/pnas.0602913103.

Coutinho-Mansfield, G. C. *et al.* (2007) 'PTB/nPTB switch: A post-transcriptional mechanism for programming neuronal differentiation', *Genes and Development*, 21(13), pp. 1573–1577. doi: 10.1101/gad.1575607.

Cowan, C. M. and Mudher, A. (2013) 'Are tau aggregates toxic or protective in tauopathies?', *Frontiers in Neurology*, 4 AUG(August), pp. 1–14. doi: 10.3389/fneur.2013.00114.

Crowther, R. A. (1991) 'Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), pp. 2288–2292. doi: 10.1073/pnas.88.6.2288.

Cui, G. H. *et al.* (2018) 'Exosomes derived from hypoxia-preconditioned mesenchymal stromal cells ameliorate cognitive decline by rescuing synaptic dysfunction and regulating inflammatory responses in APP/PS1 mice', *FASEB Journal*, 32(2), pp. 654–668. doi: 10.1096/fj.201700600R.

Czaplinski, K. *et al.* (1998) 'The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs', *Genes and Development*, 12(11), pp. 1665–1677. doi: 10.1101/gad.12.11.1665.

D

D'Souza, I. *et al.* (1999) 'Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), pp. 5598–5603. doi: 10.1073/pnas.96.10.5598.

Dang, Y. *et al.* (2009) 'Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay by the natural product pateamine A through eukaryotic initiation factor 4AIII', *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), pp. 23613–23621. doi: 10.1074/jbc.M109.009985.

Dardenne, E. *et al.* (2014) 'RNA Helicases DDX5 and DDX17 Dynamically Orchestrate Transcription, miRNA, and Splicing Programs in Cell Differentiation', *Cell Reports*, 7(6), pp. 1900–1913. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.010.

Dawson, H. N. *et al.* (2001) 'Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice.', *Journal of cell science*, 114(Pt 6), pp. 1179–1187.

Dawson, H. N. *et al.* (2007) 'The Tau N279K Exon 10 Splicing Mutation Recapitulates Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17 Tauopathy in a Mouse Model', *Journal of Neuroscience*, 27(34), pp. 9155–9168. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5492-06.2007.

Delacourte, A. *et al.* (1999) 'The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease.', *Neurology*, 52(6), pp. 1158–65. doi: 10.1212/WNL.54.2.538.

Delobel, P. *et al.* (2008) 'Analysis of tau phosphorylation and truncation in a mouse model of human tauopathy', *American Journal of Pathology*, 172(1), pp. 123–131. doi: 10.2353/ajpath.2008.070627.

Derkinderen, P. *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.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(28), pp. 6584–93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1487-05.2005.

Derkow, K. *et al.* (2018) 'Distinct expression of the neurotoxic microRNA family let-7 in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease', *PLoS ONE*, 13(7), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0200602.

Ding, Q. *et al.* (2005) 'Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(40), pp. 9171–5. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3040-05.2005.

Dixit, R. *et al.* (2008) 'Differential Regulation of Dynein and Kinesin Motor Proteins by Tau', *Science*, 319(5866), pp. 1086–1089. doi: 10.1126/science.1152993.

Drechsel, D. N. *et al.* (1992) 'Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.', *Molecular Biology of the Cell*, 3(10), pp. 1141–1154. doi: 10.1091/mbc.3.10.1141.

Drewes, G. *et al.* (1992) 'Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state', *Embo J.*, 11(0261-4189), pp. 2131–2138.

Drewes, G. *et al.* (1995) 'Microtubule-associated Protein/Microtubule Affinity-regulating Kinase (p110 mark)', *Journal of Biological Chemistry*, 270(13), pp. 7679–7688. doi: 10.1074/jbc.270.13.7679.

Dujardin, S. *et al.* (2014) 'Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism : relevance to sporadic tauopathies', pp. 1–14.

Dumanchin, C. *et al.* (1998) 'Segregation of a missense mutation in the microtubule-associated protein tau gene with familial frontotemporal dementia and parkinsonism', *Human Molecular Genetics*, 7(11), pp. 1825–1829. doi: 10.1093/hmg/7.11.1825.

Durand, S. and Lykke-Andersen, J. (2013) 'Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells', *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(6), pp. 702–709. doi: 10.1038/nsmb.2575.

Duvarci, S., Nader, K. and Ledoux, J. E. (2008) 'De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala', *Learning and Memory*, 15(10), pp. 747–755. doi: 10.1101/lm.1027208.

Dvinge, H. *et al.* (2016) 'RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors', *Nature Reviews Cancer*, 16(7), pp. 413–430. doi: 10.1038/nrc.2016.51.

E

Eberle, A. B. *et al.* (2009) 'SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells', *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(1), pp. 49–55. doi: 10.1038/nsmb.1530.

Eidenmüller, J. *et al.* (2001) 'Phosphorylation-mimicking glutamate clusters in the proline-rich region are sufficient to simulate the functional deficiencies of hyperphosphorylated tau protein.', *The Biochemical journal*, 357(Pt 3), pp. 759–67. doi: 10.1042/0264-6021:3570759.

F

Falcon, B. *et al.* (2018) 'Structures of filaments from Pick's disease reveal a novel tau protein fold', *Nature*, 561(7721), pp. 137–140. doi: 10.1038/s41586-018-0454-y.

Ferraiuolo, M. a *et al.* (2004) 'A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), pp. 4118–23. doi: 10.1073/pnas.0400933101.

Fraser, P. E. (2014) 'Prions and prion-like proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 289(29), pp. 19839–19840. doi: 10.1074/jbc.R114.583492.

Frost, B. *et al.* (2014) 'Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation', *Nature Neuroscience*, 17(3), pp. 357–366. doi: 10.1038/nn.3639.

Fuller-Pace, F. V. (2013) 'The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): Multi-tasking transcriptional regulators', *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 1829(8), pp. 756–763. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.03.004.

Fuller-Pace, F. V. and Ali, S. (2008) 'The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators', *Biochemical Society Transactions*, 36(4), pp. 609–612. doi: 10.1042/BST0360609.

Fuller-Pace, F. V and Moore, H. C. (2011) 'RNA helicases p68 and p72: multifunctional proteins with important implications for cancer development', *Future Oncology*, 7(2), pp. 239–251. doi: 10.2217/fon.11.1.

G

Gehring, N. H. *et al.* (2003) 'Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex', *Molecular Cell*, 11(4), pp. 939–949. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00142-4.

Geißler, V. *et al.* (2013) 'The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA', *Nucleic Acids Research*, 41(16), pp. 7875–7888. doi: 10.1093/nar/gkt538.

Georgieff, I. S. *et al.* (1993) 'Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems.', *Journal of cell science*, 105 (Pt 3, pp. 729–737.

Ghetti, B. *et al.* (2015) 'Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: A chameleon for neuropathology and neuroimaging', *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 41(1), pp. 24–46. doi: 10.1111/nan.12213.

Ginsberg, S. D. *et al.* (1997) 'Sequestration of RNA in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles and senile plaques', *Annals of Neurology*, 41(2), pp. 200–209. doi: 10.1002/ana.410410211.

Goedert, M. *et al.* (1988) 'Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(11), pp. 4051–4055. doi: 10.1073/pnas.85.11.4051.

Goedert, M. *et al.* (1989) 'Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain', *The EMBO journal*, 8(2), pp. 393–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=400819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Goedert, M. *et al.* (1995) 'Protein Phosphatase 2A Is the Major Enzyme in Brain that Dephosphorylates τ Protein Phosphorylated by Proline-Directed Protein Kinases or Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase', *Journal of Neurochemistry*, 65(6), pp. 2804–2807. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65062804.x.

Goedert, M. *et al.* (1996) 'Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans', *Nature*, pp. 550–553. doi: 10.1038/383550a0.

Goedert, M. *et al.* (1997) 'Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 409(1), pp. 57–62. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00483-3.

Goedert, M. and Jakes, R. (1990) 'Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization.', *The EMBO journal*, 9(13), pp. 4225–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124967>.

Gomez-Isla, T. *et al.* (1997) 'Neuron Loss Correlates with but Exceeds Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease', *Annals of Neurology*, 41(1), pp. 17–24. doi: <https://doi.org/10.1002/ana.410410106>.

Gómez de Barreda, E. *et al.* (2010) 'Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression', *FEBS Letters*, 584(11), pp. 2265–2270. doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.032.

Gong, C.-X. *et al.* (1995) 'Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain', *Journal of Neurochemistry*, 65, pp. 732–738. doi: 10.1046/j.1471-4159.1995.65020732.x.

GOODE, B. L. and FEINSTEIN, S. C. (1994) 'Identification of a Novel Microtubule-Binding and Assembly Domain in the Developmentally-Regulated Inter-Repeat Region of Tau', *Journal of Cell Biology*, 124(5), pp. 769–782. doi: 10.1083/jcb.124.5.769.

Götz, J. *et al.* (2001) 'Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau', *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), pp. 529–534. doi: 10.1074/jbc.M006531200.

Götz, J. *et al.* (2010) 'Animal models reveal role for tau phosphorylation in human disease', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(10), pp. 860–871. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.09.008.

Greenwood, J. A. and Johnson, G. V. W. (1995) 'Localization and in Situ Phosphorylation State of Nuclear Tau', *Experimental Cell Research*, 220(2), pp. 332–337. doi: 10.1006/excr.1995.1323.

Gregersen, L. H. *et al.* (2014) 'MOV10 Is a 5' to 3' RNA Helicase Contributing to UPF1 mRNA Target Degradation by Translocation along 3' UTRs', *Molecular Cell*, 54(4), pp. 573–585. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.017.

Gregory, R. I. *et al.* (2004) 'The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs', *Nature*, 432(7014), pp. 235–240. doi: 10.1038/nature03120.

Grundke-Iqbal, I. *et al.* (1986) 'Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments.', *The Journal of biological chemistry*, 261(13), pp. 6084–9.

Grundke-Iqbal, I. *et al.* (1987) 'Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein? (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology', *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 1(3), p. 202. doi: 10.1097/00002093-198701030-00020.

Guil, S. *et al.* (2003) 'Helicase in c-H- ras Alternative Splicing Regulation Roles of hnRNP A1 , SR Proteins , and p68 Helicase in c-H- ras Alternative Splicing Regulation So', 23(8), pp. 2927–2941. doi: 10.1128/MCB.23.8.2927.

Gunawardana, C. G. *et al.* (2015) 'The Human Tau Interactome: Binding to the Ribonucleoproteome, and Impaired Binding of the Proline-to-Leucine Mutant at Position 301 (P301L) to Chaperones and the Proteasome', *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(11), pp. 3000–3014. doi: 10.1074/mcp.M115.050724.

Guo, T., Noble, W. and Hanger, D. P. (2017) 'Roles of tau protein in health and disease', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 133(5), pp. 665–704. doi: 10.1007/s00401-017-1707-9.

Gustke, N. *et al.* (1994) 'Domains of tau Protein and Interactions with Microtubules', *Biochemistry*, 33(32), pp. 9511–9522. doi: 10.1021/bi00198a017.

H

Hales, C. M., Dammer, E. B., *et al.* (2014) 'Aggregates of Small Nuclear Ribonucleic Acids (snRNAs) in Alzheimer's Disease', *Brain Pathology*, 24(4), pp. 344–351. doi: 10.1111/bpa.12133.

- Hales, C. M., Seyfried, N. T., *et al.* (2014) 'U1 small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) aggregate in Alzheimer's disease due to autosomal dominant genetic mutations and trisomy 21', *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/1750-1326-9-15.
- Hamdane, M. *et al.* (2003) 'Mitotic-like Tau Phosphorylation by p25-Cdk5 Kinase Complex', *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp. 34026–34034. doi: 10.1074/jbc.M302872200.
- Hanger, D. P. *et al.* (2002) 'New Phosphorylation Sites Identified in Hyperphosphorylated Tau (Paired Helical Filament-Tau) from Alzheimer's Disease Brain Using Nano-electrospray Mass Spectrometry', *Journal of Neurochemistry*, 71(6), pp. 2465–2476. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062465.x.
- Hanger, D. P., Anderton, B. H. and Noble, W. (2009) 'Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease', *Trends in Molecular Medicine*, 15(3), pp. 112–119. doi: 10.1016/j.molmed.2009.01.003.
- Haque, N. *et al.* (1999) 'Regulation of expression, phosphorylation and biological activity of tau during differentiation in SY5Y cells', *Brain Research*, 838(1–2), pp. 69–77. doi: 10.1016/S0006-8993(99)01622-4.
- Hasegawa, M. *et al.* (1997) 'Alzheimer-like Changes in Microtubule-associated Protein Tau Induced by Sulfated Glycosaminoglycans', *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), pp. 33118–33124. doi: 10.1074/jbc.272.52.33118.
- Hasegawa, M. (2006) 'Biochemistry and molecular biology of tauopathies', *Neuropathology*, 26(5), pp. 484–490. doi: 10.1111/j.1440-1789.2006.00666.x.
- 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(3), pp. 207–210. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01217-4.
- He, F. *et al.* (2003) 'Genome-Wide Analysis of mRNAs Regulated by the Nonsense-Mediated and 5' to 3' mRNA Decay Pathways in Yeast', *Molecular Cell*, 12(6), pp. 1439–1452. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00446-5.
- He, F. and Jacobson, A. (2015) 'Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story', *Annual Review of Genetics*, 49(1), pp. 339–366. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-054639.
- Hernández, F. *et al.* (2002) 'Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments', *Journal of Neurochemistry*, 83(6), pp. 1529–1533. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01269.x.
- Le Hir, H. *et al.* (2001) 'The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay', *EMBO Journal*, 20(17), pp. 4987–4997. doi: 10.1093/emboj/20.17.4987.

- Hir, H. Le, Saulière, J. and Wang, Z. (2016) 'The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 17(1), pp. 41–54. doi: 10.1038/nrm.2015.7.
- 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(4), pp. 1449–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3139677>.
- Hoch-Kraft, P. *et al.* (2018) 'Dual role of the RNA helicase DDX5 in post-transcriptional regulation of myelin basic protein in oligodendrocytes.', *Journal of cell science*, 131(9). doi: 10.1242/jcs.204750.
- Hogg, J. R. and Goff, S. P. (2010) 'Upf1 Senses 3' UTR Length to Potentiate mRNA Decay', *Cell*. Elsevier Inc., 143(3), pp. 379–389. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.005.
- Honig, A. *et al.* (2002) 'Regulation of Alternative Splicing by the ATP-Dependent DEAD-Box RNA Helicase p72', *Molecular and Cellular Biology*, 22(16), pp. 5698–5707. doi: 10.1128/MCB.22.16.5698-5707.2002.
- Hoskins, A. A. and Moore, M. J. (2012) 'The spliceosome: A flexible, reversible macromolecular machine', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 37(5), pp. 179–188. doi: 10.1016/j.tibs.2012.02.009.
- Hosoda, N. *et al.* (2005) 'CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells', *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(10), pp. 893–901. doi: 10.1038/nsmb995.
- Hu, J. *et al.* (2018) 'PTB/nPTB: master regulators of neuronal fate in mammals', *Biophysics Reports*, 4(4), pp. 204–214. doi: 10.1007/s41048-018-0066-y.
- Hua, Q. and He, R. Q. (2003) 'Tau could protect DNA double helix structure', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1645(2), pp. 205–211. doi: 10.1016/S1570-9639(02)00538-1.
- Huang, W. *et al.* (2015) 'DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions', *Nature*. Nature Publishing Group, 528(7583), pp. 517–522. doi: 10.1038/nature16193.
- Hubbard, B. M. and Anderson, J. M. (1981) 'Age, senile dementia and ventricular enlargement', *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 44(7), pp. 631–635. doi: 10.1136/jnnp.44.7.631.
- Hug, N. and Cáceres, J. F. (2014) 'The RNA Helicase DHX34 Activates NMD by promoting a transition from the surveillance to the decay-inducing complex', *Cell Reports*, 8(6), pp. 1845–1856. doi: 10.1016/j.celrep.2014.08.020.

Hug, N., Longman, D. and Cáceres, J. F. (2015) 'Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway', *Nucleic Acids Research*, 44(4), pp. 1483–1495. doi: 10.1093/nar/gkw010.

Huntzinger, E. *et al.* (2008) 'SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan', *Rna*, 14(12), pp. 2609–2617. doi: 10.1261/rna.1386208.

Hurt, J. A., Robertson, A. D. and Burge, C. B. (2013) 'Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay', *Genome Research*, 23(10), pp. 1636–1650. doi: 10.1101/gr.157354.113.

Hutton, M. *et al.* (1998) 'Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17', *Nature*, 393(6686), pp. 702–705. doi: 10.1038/31508.

Hwang, J. *et al.* (2010) 'UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps', *Molecular Cell*, 39(3), pp. 396–409. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.004.

I

Irwin, D. J. *et al.* (2013) 'Acetylated tau neuropathology in sporadic and hereditary tauopathies', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 183(2), pp. 344–351. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.04.025.

Ishigaki, Y. *et al.* (2001) 'Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20', *Cell*, 106(5), pp. 607–617. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00475-5.

Isken, O. *et al.* (2008) 'Upf1 Phosphorylation Triggers Translational Repression during Nonsense-Mediated mRNA Decay', *Cell*, 133(2), pp. 314–327. doi: 10.1016/j.cell.2008.02.030.

Ivanov, P. and Anderson, P. (2010) 'CBP80 choreographs the NMD two-step', *Molecular Cell*, 39(3), pp. 317–318. doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.035.

Ivanov, P. V. *et al.* (2008) 'Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways', *EMBO Journal*, 27(5), pp. 736–747. doi: 10.1038/emboj.2008.17.

Izumi, N. *et al.* (2010) 'AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay', *Science Signaling*, 3(116), pp. 1–14. doi: 10.1126/scisignal.2000468.

J

Jacobs, A. M. F. *et al.* (2007) 'SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1', *Oncogene*, 26(40), pp. 5866–5876. doi: 10.1038/sj.onc.1210387.

Jalal, C., Uhlmann-Schiffler, H. and Stahl, H. (2007) 'Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation', *Nucleic Acids Research*, 35(11), pp. 3590–3601. doi: 10.1093/nar/gkm058.

Jankowsky, E. (2011) 'RNA helicases at work: Binding and rearranging', *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd, 36(1), pp. 19–29. doi: 10.1016/j.tibs.2010.07.008.

Jeganathan, S. *et al.* (2006) 'Global hairpin folding of tau in solution', *Biochemistry*, 45(7), pp. 2283–2293. doi: 10.1021/bi0521543.

Jensen, E. D. *et al.* (2008) 'p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation', *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(5), pp. 1438–1451. doi: 10.1002/jcb.21526.

Jia, Y., Mu, J. C. and Ackerman, S. L. (2012) 'Mutation of a U2 snRNA Gene causes global disruption of alternative splicing and neurodegeneration', *Cell*. Elsevier Inc., 148(1–2), pp. 296–308. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.057.

Jiang, H. *et al.* (2004) 'Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons', *Human Molecular Genetics*, 13(24), pp. 3079–3088. doi: 10.1093/hmg/ddh327.

Jicha, G. A. *et al.* (1997) 'Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau', *Journal of Neuroscience Research*, 48(2), pp. 128–132. doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19970415)48:2<128::AID-JNR5>3.0.CO;2-E.

Jicha, G. a *et al.* (1999) 'cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(17), pp. 7486–7494.

Jolly, L. A. *et al.* (2013) 'The UPF3B gene, implicated in intellectual disability, autism, ADHD and childhood onset schizophrenia regulates neural progenitor cell behaviour and neuronal outgrowth', *Human Molecular Genetics*, 22(23), pp. 4673–4687. doi: 10.1093/hmg/ddt315.

Jurica, M. S. and Moore, M. J. (2002) 'Capturing splicing complexes to study structure and mechanism', *Methods*, 28(3), pp. 336–345. doi: 10.1016/S1046-2023(02)00240-2.

K

Kadavath, H. *et al.* (2015) 'Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), pp. 7501–7506. doi: 10.1073/pnas.1504081112.

Kadlec, J., Izaurralde, E. and Cusack, S. (2004) 'The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3', *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(4), pp. 330–337. doi: 10.1038/nsmb741.

Kahlina, K. *et al.* (2004) 'p68 DEAD box RNA helicase expression in keratinocytes: Regulation, nucleolar localization, and functional connection to proliferation and vascular endothelial growth factor gene expression', *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), pp. 44872–44882. doi: 10.1074/jbc.M402467200.

Kampers, T. *et al.* (1996) 'RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments.', *FEBS letters*, 399(3), pp. 344–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8985176>.

Kanemaru, K. *et al.* (1992) 'Fetal-Type Phosphorylation of the τ in Paired Helical Filaments', *Journal of Neurochemistry*, 58(5), pp. 1667–1675. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10039.x.

Kar, A. *et al.* (2011) 'RNA Helicase p68 (DDX5) Regulates tau Exon 10 Splicing by Modulating a Stem-Loop Structure at the 5' Splice Site', *Molecular and Cellular Biology*, 31(9), pp. 1812–1821. doi: 10.1128/MCB.01149-10.

Karousis, E. D. and Mühlemann, O. (2018) 'Nonsense-Mediated mRNA Decay Begins Where Translation Ends', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, p. a032862. doi: 10.1101/cshperspect.a032862.

Kashima, I. *et al.* (2006) 'Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a surveillance mechanism that degrades mRNA containing premature termination codons (PTCs). In mammalian cells, recognition of PTCs requires translation and depends on the presence on the mRNA with the splicing-depend', *Genes & Development*, pp. 355–367. doi: 10.1101/gad.1389006.phenotype.

Kelemen, O. *et al.* (2013) 'Function of alternative splicing Olga', *Gene*, 514(1), pp. 1–30. doi: 10.1016/j.gene.2012.07.083.Function.

Keppetipola, N. M. *et al.* (2016) 'Multiple determinants of splicing repression activity in the polypyrimidine tract binding proteins, PTBP1 and PTBP2', *Rna*, 22(8), pp. 1172–1180. doi: 10.1261/rna.057505.116.

Kidd, M. (1963) 'Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's Disease', *Nature*, 197(4863), pp. 192–193. doi: 10.1038/197192b0.

Kim, V. N., Kataoka, N. and Dreyfuss, G. (2001) 'Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex', *Science*, 293(5536), pp. 1832–1836. doi: 10.1126/science.1062829.

Kiuchi, A. *et al.* (1991) 'Presenile appearance of abundant Alzheimer's neurofibrillary tangles without senile plaques in the brain in myotonic dystrophy.', *Acta neuropathologica*, 82(1), pp. 1–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1950473>.

Knops, J. *et al.* (1991) 'Overexpression of tau in a nonneuronal cell induces long cellular processes.', *The Journal of cell biology*, 114(4), pp. 725–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1678391>.

Komori, T. *et al.* (1998) 'Inducible nitric oxide synthase (iNOS) -like immunoreactivity in argyrophilic , tau-positive astrocytes in progressive supranuclear palsy', *Acta Neuropathologica*, pp. 338–344.

Kopeikina, K. J. *et al.* (2011) 'Tau accumulation causes mitochondrial distribution deficits in neurons in a mouse model of tauopathy and in human Alzheimer's disease brain', *American Journal of Pathology*. Elsevier Inc., 179(4), pp. 2071–2082. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.004.
Kopke, E. *et al.* (1993) 'Microtubule-associated Protein Tau', (18), pp. 24374–24384.

Krecic, A. M. and Swanson, M. S. (1999) 'hnRNP complexes: composition, structure, and function', *Current Opinion in Cell Biology*, 11(3), pp. 363–371. doi: 10.1016/S0955-0674(99)80051-9.

Ksiezak-Reding, H., Liu, W. K. and Yen, S. H. (1992) 'Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments', *Brain Research*, 597(2), pp. 209–219. doi: 10.1016/0006-8993(92)91476-U.

Kunz, J. B. (2006) 'Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation', *RNA*, 12(6), pp. 1015–1022. doi: 10.1261/rna.12506.

Kuret, J. *et al.* (2005) 'Pathways of tau fibrillization', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), pp. 167–178. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.016.

Kwok, J. B. J. *et al.* (2004) 'Tau Haplotypes Regulate Transcription and Are Associated with Parkinson's Disease', *Annals of Neurology*, 55(3), pp. 329–334. doi: 10.1002/ana.10826.

L

Lambert, M.-P. *et al.* (2018) 'The RNA helicase DDX17 controls the transcriptional activity of REST and the expression of proneural microRNAs in neuronal differentiation', *Nucleic Acids Research*, (July), pp. 1–15. doi: 10.1093/nar/gky545.

Lane, D. P. and Hoeffler, W. K. (1980) 'SV40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68,000', *Nature*, 288(5787), pp. 167–170. doi: 10.1038/288167a0.

Langstrom, N. S. *et al.* (1989) 'Alzheimer's disease-associated reduction of polysomal mRNA translation', *Molecular Brain Research*, 5(4), pp. 259–269. doi: 10.1016/0169-328X(89)90060-0.

Lareau, L. F. *et al.* (2007) 'Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements', *Nature*, 446(7138), pp. 926–929. doi: 10.1038/nature05676.

Lasagna-reeves, C. A. *et al.* (2012) 'Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau'. doi: 10.1038/srep00700.

- Laurent, F. X. *et al.* (2012) 'New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats', *Nucleic Acids Research*, 40(7), pp. 3159–3171. doi: 10.1093/nar/gkr1228.
- Leboucher, A. *et al.* (2013) 'Detrimental Effects of Diet-Induced Obesity on Pathology Are Independent of Insulin Resistance in Transgenic Mice', *Diabetes*, 62(5), pp. 1681–1688. doi: 10.2337/db12-0866.
- Lee, C. G. (2002) 'Rh70, a bidirectional RNA helicase, co-purifies with U1snRNP', *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp. 39679–39683. doi: 10.1074/jbc.C200337200.
- Lee, Y. J., Wang, Q. and Rio, D. C. (2018) 'Coordinate regulation of alternative pre-mRNA splicing events by the human RNA chaperone proteins hnRNPA1 and DDX5', pp. 1–15. doi: 10.1101/gad.316034.118.
- Lee, Y. and Rio, D. C. (2015) 'Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing', *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), pp. 291–323. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034316.
- Lejeune, F. *et al.* (2002) 'The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: Dynamics of mRNP remodeling', *EMBO Journal*, 21(13), pp. 3536–3545. doi: 10.1093/emboj/cdf345.
- Lejeune, F., Li, X. and Maquat, L. E. (2003) 'Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities', *Molecular Cell*, 12(3), pp. 675–687. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00349-6.
- Lejeune, F. and Maquat, L. E. (2005) 'Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells', *Current Opinion in Cell Biology*, 17(3), pp. 309–315. doi: 10.1016/j.ceb.2005.03.002.
- Lewis, B. P., Green, R. E. and Brenner, S. E. (2003) 'Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1), pp. 189–192. doi: 10.1073/pnas.0136770100.
- Li, B. *et al.* (2007) 'Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau', *Acta Neuropathologica*, 113(5), pp. 501–511. doi: 10.1007/s00401-007-0207-8.
- Li, Q. *et al.* (2014) 'The splicing regulator PTBP2 controls a program of embryonic splicing required for neuronal maturation', *eLife*, 2014(3), pp. 1–24. doi: 10.7554/eLife.01201.001.
- Li, T. *et al.* (2015) 'Smg6/Est1 licenses embryonic stem cell differentiation via nonsense-mediated mRNA decay', *The EMBO Journal*, 34(12), pp. 1630–1647. doi: 10.15252/embj.201489947.

Lilleväli, K., Kulla, A. and Örd, T. (2001) 'Comparative expression analysis of the genes encoding polypyrimidine tract binding protein (PTB) and its neural homologue (brPTB) in prenatal and postnatal mouse brain', *Mechanisms of Development*, 101(1–2), pp. 217–220. doi: 10.1016/S0925-4773(00)00566-9.

Lin, C. *et al.* (2005) 'ATPase / Helicase Activities of p68 RNA Helicase Are Required for Pre-mRNA Splicing but Not for Assembly of the Spliceosome ATPase / Helicase Activities of p68 RNA Helicase Are Required for Pre-mRNA Splicing but Not for Assembly of the Spliceosome', *Molecular and cellular biology*, 25(17), pp. 7484–7493. doi: 10.1128/MCB.25.17.7484.

Linares, A. J. *et al.* (2015) 'The splicing regulator PTBP1 controls the activity of the transcription factor Pbx1 during neuronal differentiation', *eLife*, 4(DECEMBER2015), pp. 1–25. doi: 10.7554/eLife.09268.

Linder, P. and Jankowsky, E. (2011) 'From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 12(8), pp. 505–516. doi: 10.1038/nrm3154.

Lindwall, G. and Cole, R. D. (1984) 'Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly', *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), pp. 5301–5305.

Liu, C. and Götz, J. (2013) 'Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus', *PLoS ONE*, 8(12), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0084849.

Liu, F. *et al.* (2004) 'O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in Alzheimer's disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29), pp. 10804–10809. doi: 10.1073/pnas.0400348101.

Liu, F. *et al.* (2005) 'Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation', *European Journal of Neuroscience*, 22(8), pp. 1942–1950. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04391.x.

Liu, F., Putnam, A. and Jankowsky, E. (2008) 'ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), pp. 20209–20214. doi: 10.1073/pnas.0811115106.

Liu, Z.-R. (2002) 'p68 RNA Helicase Is an Essential Human Splicing Factor That Acts at the U1 snRNA-5' Splice Site Duplex', *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), pp. 5443–5450. doi: 10.1128/MCB.22.15.5443-5450.2002.

Llorian, M. *et al.* (2010) 'Position-dependent alternative splicing activity revealed by global profiling of alternative splicing events regulated by PTB', *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 17(9), pp. 1114–1123. doi: 10.1038/nsmb.1881.

Loh, B., Jonas, S. and Izaurralde, E. (2013) 'The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2', *Genes and Development*, 27(19), pp. 2125–2138. doi: 10.1101/gad.226951.113.

Long, J. C. and Caceres, J. F. (2009) 'The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression', *Biochemical Journal*, 417(1), pp. 15–27. doi: 10.1042/BJ20081501.

Loomis, P. A. *et al.* (1990) 'Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells', *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 87(0027-8424), pp. 8422–8426. doi: DOI 10.1073/pnas.87.21.8422.

LoPresti, P., Muma, N. a and De Vries, G. H. (2001) 'Neu differentiation factor regulates tau protein and mRNA in cultured neonatal oligodendrocytes.', *Glia*, 35(2), pp. 147–55.

Lu, P. J. *et al.* (1999) 'The prolyl isomerase Pin 1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein', *Nature (London)*, 399(1986), pp. 784–788.

Lu, T. *et al.* (2014) 'REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease.', *Nature*, 507(7493), pp. 448–54. doi: 10.1038/nature13163.

Lu, Y. *et al.* (2013) 'Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection', *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(3), pp. 551–563. doi: 10.3233/JAD-130602.

Lucas, J. J. *et al.* (2001) 'Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice.', *The EMBO journal*, 20(1–2), pp. 27–39. doi: 10.1093/emboj/20.1.27.

Lukiw, W. J. (2007) 'Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus', *NeuroReport*, 18(3), pp. 297–300. doi: 10.1097/WNR.0b013e3280148e8b.

Luo, H.-B. *et al.* (2014) 'SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(46), pp. 16586–16591. doi: 10.1073/pnas.1417548111.

Luo, M. H. *et al.* (2004) 'Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain', *Journal of Neurochemistry*, 90(2), pp. 340–351. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02508.x.

M

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', *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), pp. 15733–15740. doi: 10.1074/jbc.M000389200.

Maeda, S. *et al.* (2006) 'Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease', *Neuroscience Research*, 54(3), pp. 197–201. doi: 10.1016/j.neures.2005.11.009.

- Maekawa, S. *et al.* (2009) 'TDP-43 is consistently co-localized with ubiquitinated inclusions in sporadic and Guam amyotrophic lateral sclerosis but not in familial amyotrophic lateral sclerosis with and without SOD1 mutations', *Neuropathology*, 29(6), pp. 672–683. doi: 10.1111/j.1440-1789.2009.01029.x.
- Maina, M. B. *et al.* (2018) 'The involvement of tau in nucleolar transcription and the stress response'. *Acta Neuropathologica Communications*, pp. 1–13.
- Maina, M. B., Al-Hilaly, Y. K. and Serpell, L. C. (2016) 'Nuclear tau and its potential role in Alzheimer's disease', *Biomolecules*, 6(1), pp. 2–20. doi: 10.3390/biom6010009.
- Makeyev, E. V. *et al.* (2007) 'The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing', *Molecular Cell*, 27(3), pp. 435–448. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.015.
- Mandelkow, E. *et al.* (2011) 'of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Overexpression of Vesicles , Mitochondria , and Endoplasmic Trafficking Reticulum : for Alzheimer ' s Disease Implications', *Cell*, 143(3), pp. 777–794. doi: 10.1083/jcb.143.3.777.
- Mansuroglu, Z. *et al.* (2016) 'Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin', *Scientific Reports*, 6, pp. 1–16. doi: 10.1038/srep33047.
- Marciniak, E. *et al.* (2017) 'Tau deletion promotes brain insulin resistance', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(8), pp. 2257–2269. doi: 10.1084/jem.20161731.
- Martin, L., Latypova, X. and Terro, F. (2011) 'Post-translational modifications of tau protein: Implications for Alzheimer's disease', *Neurochemistry International*. Elsevier Ltd, 58(4), pp. 458–471. doi: 10.1016/j.neuint.2010.12.023.
- Mattson, M. P., Gleichmann, M. and Cheng, A. (2008) 'Mitochondria in Neuroplasticity and Neurological Disorders', *Neuron*, 60(5), pp. 748–766. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.010.
- McGlinchy, N. J. and Smith, C. W. J. (2008) 'Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense?', *Trends in Biochemical Sciences*, 33(8), pp. 385–393. doi: 10.1016/j.tibs.2008.06.001.
- Meier, S. *et al.* (2016) 'Pathological Tau Promotes Neuronal Damage by Impairing Ribosomal Function and Decreasing Protein Synthesis', *Journal of Neuroscience*, 36(3), pp. 1001–1007. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3029-15.2016.
- Melero, R. *et al.* (2014) 'Structures of SMG1-UPFs complexes: SMG1 contributes to regulate UPF2-dependent activation of UPF1 in NMD', *Structure*, 22(8), pp. 1105–1119. doi: 10.1016/j.str.2014.05.015.

Mendell, J. T. *et al.* (2004) 'Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise', *Nature Genetics*, 36(10), pp. 1073–1078. doi: 10.1038/ng1429.

Metuzals, J. *et al.* (1988) 'Paired helical filaments and the cytoplasmic-nuclear interface in Alzheimer's disease', *Journal of Neurocytology*, 17(6), pp. 827–833. doi: 10.1007/BF01216709.

Min, S.-W. *et al.* (2010) 'Acetylation of Tau Inhibits Its Degradation and Contributes to Tauopathy', *Neuron*, 67(6), pp. 953–966. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.044.

Min, S. W. *et al.* (2015) 'Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 21(10), pp. 1154–1162. doi: 10.1038/nm.3951.

Mondragón-Rodríguez, S. *et al.* (2012) 'Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation', *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp. 32040–32053. doi: 10.1074/jbc.M112.401240.

Moriarty, P. M., Reddy, C. C. and Maquat, L. E. (1998) 'Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA', *Molecular and Cellular Biology*, 18(5), pp. 2932–2839. doi: 10.1128/MCB.18.5.2932.

Morris, Meaghan, Mucke, L. (2012) 'Many faces of Tau', 70(3), pp. 410–426. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.009.The.

Mount, S. M. (1982) 'A catalogue of splice junction sequences.', *Nucleic acids research*, 10(2), pp. 459–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7063411>.

Mukrasch, M. D. *et al.* (2007) 'The "jaws" of the tau-microtubule interaction', *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), pp. 12230–12239. doi: 10.1074/jbc.M607159200.

Mukrasch, M. D. *et al.* (2009) 'Structural polymorphism of 441-residue Tau at single residue resolution', *PLoS Biology*, 7(2), pp. 0399–0414. doi: 10.1371/journal.pbio.1000034.

Murray, M. E. *et al.* (2014) 'Clinicopathologic assessment and imaging of tauopathies in neurodegenerative dementias', *Alzheimer's Research and Therapy*, 6(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/alzrt231.

N

Nagy, E. and Maquat, L. E. (1998) 'A rule for termination-codon position within intron-containing genes: When nonsense affects RNA abundance', *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), pp. 198–199. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01208-0.

- Nasim, M. T. and Eperon, I. C. (2006) 'A double-reporter splicing assay for determining splicing efficiency in mammalian cells', *Nature Protocols*, 1(2), pp. 1022–1028. doi: 10.1038/nprot.2006.148.
- Neubauer, G. *et al.* (1998) 'Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex', *Nature Genetics*, 20(1), pp. 46–50. doi: 10.1038/1700.
- Neumann, M. *et al.* (2006) 'Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis', *Science*, 314(5796), pp. 130–133. doi: 10.1126/science.1134108.
- Neve, R. L. *et al.* (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', *Molecular Brain Research*, 1(3), pp. 271–280. doi: 10.1016/0169-328X(86)90033-1.
- Nguyen, L. S. *et al.* (2012) 'Transcriptome profiling of UPF3B/NMD-deficient lymphoblastoid cells from patients with various forms of intellectual disability', *Molecular Psychiatry*, 17(11), pp. 1103–1115. doi: 10.1038/mp.2011.163.
- Nickless, A., Bailis, J. M. and You, Z. (2017) 'Control of gene expression through the nonsense-mediated RNA decay pathway', *Cell and Bioscience*. BioMed Central, 7(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13578-017-0153-7.
- Nicol, S. M. *et al.* (2013) 'The RNA helicase p68 (DDX5) is selectively required for the induction of p53-dependent p21 expression and cell-cycle arrest after DNA damage', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(29), pp. 3461–3469. doi: 10.1038/onc.2012.426.
- Noble, W. *et al.* (2013) 'The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases', *Frontiers in Neurology*, 4 JUL(July), pp. 1–11. doi: 10.3389/fneur.2013.00083.
- Nunomura, A. *et al.* (2001) 'Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), pp. 759–767. doi: 10.1093/jnen/60.8.759.
- Nunomura, A. *et al.* (2012) 'The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 71(3), pp. 233–241. doi: 10.1097/NEN.0b013e318248e614.
- Nyikó, T. *et al.* (2009) 'Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner', *Plant Molecular Biology*, 71(4–5), pp. 367–378. doi: 10.1007/s11103-009-9528-4.

O

Obulesu, M. and Rao, D. M. (2010) 'DNA damage and impairment of DNA repair in Alzheimer's disease', *International Journal of Neuroscience*, 120(6), pp. 397–403. doi: 10.3109/00207450903411133.

Ohnishi, T. *et al.* (2003) 'Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7', *Molecular Cell*, 12(5), pp. 1187–1200. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00443-X.

Okada-Katsuhata, Y. *et al.* (2012) 'N-and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD', *Nucleic Acids Research*, 40(3), pp. 1251–1266. doi: 10.1093/nar/gkr791.

Oyama, F. *et al.* (2004) 'Gem GTPase and Tau: Morphological changes induced by Gem GTPase in CHO cells are antagonized by tau', *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), pp. 27272–27277. doi: 10.1074/jbc.M401634200.

P

Palacios, I. M. *et al.* (2004) 'An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay', *Nature*, 427(February), pp. 753–757. doi: 10.1038/nature02305.1.

Panda, D. *et al.* (1995) 'Kinetic Stabilization of Microtubule Dynamics at Steady State by Tau and Microtubule-Binding Domains of Tau', *Biochemistry*, 34(35), pp. 11117–11127. doi: 10.1021/bi00035a017.

Papasozomenos, S. C. and Binder, L. I. (1987) 'Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system.', *Cell motility and the cytoskeleton*, 8(3), pp. 210–226. doi: 10.1002/cm.970080303.

Park, S. A., Ahn, S. II and Gallo, J. M. (2016) 'Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders', *BMB Reports*, 49(8), pp. 405–413. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.8.084.

Pei, J. J. *et al.* (1998) 'Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration', *Brain Research*, 797(2), pp. 267–277. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00296-0.

Perez, M. *et al.* (2009) 'Tau - An inhibitor of deacetylase HDAC6 function', *Journal of Neurochemistry*, 109(6), pp. 1756–1766. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x.

Peterson, D. W. *et al.* (2008) 'A soluble oligomer of tau associated with fiber formation analyzed by NMR', *Biochemistry*, 47(28), pp. 7393–7404. doi: 10.1021/bi702466a.

Petrucelli, L. *et al.* (2004) 'CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation', *Human Molecular Genetics*, 13(7), pp. 703–714. doi: 10.1093/hmg/ddh083.

Piao, Y.-S. *et al.* (2002) 'Cerebellar cortical tau pathology in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration', *Acta Neuropathologica*, 103(5), pp. 469–474. doi: 10.1007/s00401-001-0488-2.

Pittman, A. M. *et al.* (2005) 'Linkage disequilibrium fine mapping and haplotype association analysis of the tau gene in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration', *Journal of Medical Genetics*, 42(11), pp. 837–846. doi: 10.1136/jmg.2005.031377.

Planel, E. *et al.* (2007) 'Anesthesia Leads to Tau Hyperphosphorylation through Inhibition of Phosphatase Activity by Hypothermia', *Journal of Neuroscience*, 27(12), pp. 3090–3097. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4854-06.2007.

Pope, W. *et al.* (1994) 'Microtubule-associated protein tau is hyperphosphorylated during mitosis in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y', *Experimental Neurology*, pp. 185–194.

Q

Qi, H. *et al.* (2015) 'Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation', *Biochemistry*, 54(7), pp. 1525–1533. doi: 10.1021/bi5014613.

Qi, H. *et al.* (2016) 'Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), pp. 7742–7753. doi: 10.1074/jbc.M115.700914.

R

Rademakers, R. *et al.* (2005) 'High-density SNP haplotyping suggests altered regulation of tau gene expression in progressive supranuclear palsy', *Human Molecular Genetics*, 14(21), pp. 3281–3292. doi: 10.1093/hmg/ddi361.

Rapoport, M. *et al.* (2002) 'Tau is essential to α -amyloid-induced neurotoxicity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), pp. 6364–6369. doi: 10.1073/pnas.092136199.

Reitz, C. and Mayeux, R. (2014) 'Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 88(4), pp. 640–651. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.024.

Reynolds, C. H. *et al.* (2008) 'Phosphorylation regulates tau interactions with Src homology 3 domains of phosphatidylinositol 3-kinase, phospholipase C γ 1, Grb2, and Src family kinases', *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), pp. 18177–18186. doi: 10.1074/jbc.M709715200.

Rodriguez-Rodriguez, P. *et al.* (2017) 'Tau hyperphosphorylation induces oligomeric insulin accumulation and insulin resistance in neurons', *Brain*, 140(12), pp. 3269–3285. doi: 10.1093/brain/awx256.

Rohn, T. T. *et al.* (2001) 'Correlation between caspase activation and neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 158(1), pp. 189–198. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63957-0.

Rozen, F. *et al.* (1990) 'Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F.', *Molecular and cellular biology*, 10(3), pp. 1134–44. doi: 10.1128/MCB.10.3.1134.

Rufener, S. C. and Mühlemann, O. (2013) 'EIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells', *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(6), pp. 710–717. doi: 10.1038/nsmb.2576.

S

Sallam, T. *et al.* (2018) 'Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 24(3), pp. 304–312. doi: 10.1038/nm.4479.

Samaan, S. *et al.* (2014) 'The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases are cornerstones in the complex regulatory array of steroid hormone-signaling pathways', *Nucleic Acids Research*, 42(4), pp. 2197–2207. doi: 10.1093/nar/gkt1216.

Santacruz, K. *et al.* (2005) 'Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function.', *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), pp. 476–81. doi: 10.1126/science.1113694.

Sauliere, J. *et al.* (2006) 'The Polypyrimidine Tract Binding Protein (PTB) Represses Splicing of Exon 6B from the β -Tropomyosin Pre-mRNA by Directly Interfering with the Binding of the U2AF65 Subunit', *Molecular and Cellular Biology*, 26(23), pp. 8755–8769. doi: 10.1128/MCB.00893-06.

Saulière, J. *et al.* (2012) 'CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex', *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(11), pp. 1124–1131. doi: 10.1038/nsmb.2420.

Schmidt, S. A. *et al.* (2015) 'Identification of SMG6 cleavage sites and a preferred RNA cleavage motif by global analysis of endogenous NMD targets in human cells', *Nucleic Acids Research*, 43(1), pp. 309–323. doi: 10.1093/nar/gku1258.

Schneider, a *et al.* (1999) 'Phosphorylation that detaches tau from microtubules S262 and S214 protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments', *Journal of neurochemistry*, 73, pp. S26–S26.

Schoenberg, D. R. and Maquat, L. E. (2012) 'Regulation of cytoplasmic mRNA decay', *Nature Reviews Genetics*, 13(4), pp. 246–259. doi: 10.1038/nrg3160.

Sengupta, A. *et al.* (1998) 'Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357(2), pp. 299–309. doi: 10.1006/abbi.1998.0813.

Sergeant, N. *et al.* (1995) 'Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins', *NeuroReport*, pp. 2217–2220. doi: 10.1097/00001756-199511000-00028.

Sergeant, N. *et al.* (1997) 'Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 412(3), pp. 578–582. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00859-4.

Sergeant, N. *et al.* (2001) 'Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1.', *Human molecular genetics*, 10(19), pp. 2143–55. doi: 10.1093/hmg/10.19.2143.

Sergeant, N. *et al.* (2008) 'Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders', *Expert Review of Proteomics*, 5(2), pp. 207–224. doi: 10.1586/14789450.5.2.207.

Sergeant, N., Delacourte, A. and Buée, L. (2005) 'Tau protein as a differential biomarker of tauopathies', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), pp. 179–197. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.020.

Sergeant, N., Wattez, 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(3), pp. 1243–1249. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0721243.x.

Serin, G. *et al.* (2001) 'Identification and Characterization of Human Orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 Protein and Upf3 Protein (Identification and Characterization of Human Orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 Protein and Upf3 Protein (*Caenorhabditis elegans*)', *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), pp. 209–223. doi: 10.1128/MCB.21.1.209.

Shin, S. and Janknecht, R. (2007) 'Concerted activation of the Mdm2 promoter by p72 RNA helicase and the coactivators p300 and P/CAF', *Journal of Cellular Biochemistry*, 101(5), pp. 1252–1265. doi: 10.1002/jcb.21250.

Silva, A. L. *et al.* (2008) 'Proximity of the poly (A) -binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay Proximity of the poly (A) -binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay', pp. 563–576. doi: 10.1261/rna.815108.).

Silva, A. L. and Romão, L. (2009) 'The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway : To decay or not to decay ! Which players make the decision ?', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 583(3), pp. 499–505. doi: 10.1016/j.febslet.2008.12.058.

Singh, G., Rebbapragada, I. and Lykke-Andersen, J. (2008) 'A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay', *PLoS Biology*, 6(4), pp. 860–871. doi: 10.1371/journal.pbio.0060111.

Singleton, M. R., Dillingham, M. S. and Wigley, D. B. (2007) 'Structure and Mechanism of Helicases and Nucleic Acid Translocases', *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), pp. 23–50. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300.

Sjoberg, M. K. (2006) 'Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization', *Journal of Cell Science*, 119(10), pp. 2025–2034. doi: 10.1242/jcs.02907.

Smet-Nocca, C. *et al.* (2011) 'Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation', *Molecular BioSystems*, 7(5), pp. 1420–1429. doi: 10.1039/c0mb00337a.

Sottejeau, Y. *et al.* (2015) 'Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain', *Acta neuropathologica communications*, 3, p. 58. doi: 10.1186/s40478-015-0237-8.

Sperfeld, A. *et al.* (1999) 'FTDP-17: An early onset phenotype with parkinsonism and epileptic seizures caused by a novel mutation', *Annals of Neurology*, 46(5), pp. 708–715. doi: 10.1002/1531-8249(199911)46:5<708::AID-ANA5>3.0.CO;2-K.

Stamer, K. *et al.* (2002) 'Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress', *Journal of Cell Biology*, 156(6), pp. 1051–1063. doi: 10.1083/jcb.200108057.

Stamm, S. *et al.* (1994) 'A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons', *Nucleic Acids Research*, 22(9), pp. 1515–1526. doi: 10.1093/nar/22.9.1515.

Stokin, G. B. *et al.* (2005) 'Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's diseases', *Science*, 307(5713), pp. 1282–1288. doi: 10.1126/science.1105681.

Sultan, A. *et al.* (2011) 'Nuclear Tau, a key player in neuronal DNA protection', *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), pp. 4566–4575. doi: 10.1074/jbc.M110.199976.

Sun, X. *et al.* (1998) 'A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(August), pp. 10009–10014. doi: 10.1073/pnas.95.17.10009.

Sureau, A. *et al.* (2001) 'SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs', *EMBO Journal*, 20(7), pp. 1785–1796. doi: 10.1093/emboj/20.7.1785.

T

Talimat-Amar, Y., Arribat, Y. and Parmentier, M. L. (2018) 'Vesicular axonal transport is modified in vivo by tau deletion or overexpression in *Drosophila*', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3). doi: 10.3390/ijms19030744.

Tamayev, R. *et al.* (2010) 'Memory Deficits Due to Familial British Dementia BRI2 Mutation Are Caused by Loss of BRI2 Function Rather than Amyloidosis', *Journal of Neuroscience*, 30(44), pp. 14915–14924. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3917-10.2010.

Tanner, N. K. *et al.* (2003) 'The Q motif: A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis', *Molecular Cell*, 11(1), pp. 127–138. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00006-6.

Tashiro, K. *et al.* (1997) 'Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex.', *Neuroreport*, 8(12), pp. 2797–2801. doi: 10.1097/00001756-199708180-00029.

Terry, R. D. *et al.* (1991) 'Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer ' s Disease : Synapse h s s ls the Major Correlate of Cognitive Impairment', *Annals of Neurology*, 30(4), pp. 572–580.

Thurston, V. C., Zinkowski, R. P. and Binder, L. I. (1996) 'Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo.', *Chromosoma*, 105(1), pp. 20–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662255>.

Tollervey, J. R. *et al.* (2011) 'Analysis of alternative splicing associated with aging and neurodegeneration in the human brain.', *Genome research*, 21(10), pp. 1572–82. doi: 10.1101/gr.122226.111.

Tolnay, M. and Probst, A. (2003) 'The neuropathological spectrum of neurodegenerative tauopathies', *IUBMB Life*, 55(6), pp. 299–305. doi: 10.1080/1521654032000114348.

Tracy, T. E. *et al.* (2016) 'Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss', *Neuron*. Elsevier Inc., 90(2), pp. 245–260. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.005.

Trojanowski, J. Q. and Lee, V. M. Y. (2005) 'Pathological tau: A loss of normal function or a gain in toxicity?', *Nature Neuroscience*, 8(9), pp. 1136–1137. doi: 10.1038/nn0905-1136.

Turunen, J. J. *et al.* (2013) 'The significant other: Splicing by the minor spliceosome', *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(1), pp. 61–76. doi: 10.1002/wrna.1141.

Tuteja, N., Vashisht, A. A. and Tuteja, R. (2008) 'Translation initiation factor 4A: A prototype member of dead-box protein family', *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14(1–2), pp. 101–107. doi: 10.1007/s12298-008-0009-z.

U

Uhlmann-Schiffler, H., Rössler, O. G. and Stahl, H. (2002) 'The mRNA of DEAD box protein p72 is alternatively translated into an 82-kDa RNA helicase', *Journal of Biological Chemistry*, 277(2), pp. 1066–1075. doi: 10.1074/jbc.M107535200.

Unterholzner, L. and Izaurralde, E. (2004) 'SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay', *Molecular Cell*, 16(4), pp. 587–596. doi: 10.1016/j.molcel.2004.10.013.

V

Vanderweyde, T. *et al.* (2012) 'Contrasting Pathology of the Stress Granule Proteins TIA-1 and G3BP in Tauopathies', *Journal of Neuroscience*, 32(24), pp. 8270–8283. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1592-12.2012.

Vanderweyde, T. *et al.* (2017) 'HHS Public Access', 15(7), pp. 1455–1466. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.045.Interaction.

Violet, M. *et al.* (2014) 'A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(March), pp. 1–11. doi: 10.3389/fncel.2014.00084.

Violet, M. *et al.* (2015) 'Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo', *Neurobiology of Disease*, 82, pp. 540–551. doi: 10.1016/j.nbd.2015.09.003.

Vuong, J. K. *et al.* (2016) 'PTBP1 and PTBP2 Serve Both Specific and Redundant Functions in Neuronal Pre-mRNA Splicing', *Cell Reports*, 17(10), pp. 2766–2775. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.034.

W

Wang, D., Huang, J. and Hu, Z. (2012) 'RNA Helicase DDX5 Regulates MicroRNA Expression and Contributes to Cytoskeletal Reorganization in Basal Breast Cancer Cells', *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(2), p. M111.011932. doi: 10.1074/mcp.M111.011932.

Wang, H. *et al.* (2009) 'P68 RNA helicase is a nucleocytoplasmic shuttling protein', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 19(12), pp. 1388–1400. doi: 10.1038/cr.2009.113.

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(3), pp. 825–832. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03615.x.

- Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2007) 'Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration', *European Journal of Neuroscience*, 25(1), pp. 59–68. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x.
- Wang, X. *et al.* (2006) 'The proline-rich domain and the microtubule binding domain of protein tau acting as RNA binding domains', *Protein Pept Lett*, 13(7), pp. 679–685. doi: 10.2174/092986606777790566.
- Wang, Y. *et al.* (1993) 'A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau', *Journal of Cell Biology*, 121(2), pp. 257–267. doi: 10.1083/jcb.121.2.257.
- Wang, Y. and Mandelkow, E. (2016) 'Tau in physiology and pathology', *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), pp. 5–21. doi: 10.1038/nrn.2015.1.
- Watanabe, A. *et al.* (2004) 'Molecular aging of tau: Disulfide-independent aggregation and non-enzymatic degradation in vitro and in vivo', *Journal of Neurochemistry*, 90(6), pp. 1302–1311. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02611.x.
- Wei, Y. *et al.* (2008) 'Binding to the minor groove of the double-strand, Tau protein prevents DNA damage by peroxidation', *PLoS ONE*, 3(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002600.
- Weingarten, M. D. *et al.* (1975) 'A protein factor essential for microtubule assembly.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), pp. 1858–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1057175>.
- Weischenfeldt, J. *et al.* (2012) 'Mammalian tissues defective in nonsense-mediated mRNA decay display highly aberrant splicing patterns', *Genome Biology*. BioMed Central Ltd, 13(5), p. R35. doi: 10.1186/gb-2012-13-5-r35.
- West, M. J. *et al.* (1994) 'Differences in the Pattern of Hippocampal Neuronal Loss in Normal Aging and Alzheimers-Disease', *Lancet*, 344, pp. 769–772. doi: 10.1016/S0140-6736(94)92338-8.
- Whitwell, J. L. *et al.* (2008) 'MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy: A voxel-based morphometry study', *Neurology*, 71(10), pp. 743–749. doi: 10.1212/01.wnl.0000324924.91351.7d.
- Wilson, B. J. *et al.* (2004) 'The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner', *BMC Molecular Biology*, 5, pp. 1–15. doi: 10.1186/1471-2199-5-11.
- Wischik, C. M. *et al.* (1988) 'Isolation of a fragment of tau derived from the core of the paired helical filament of Alzheimer disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), pp. 4506–4510. doi: 10.1073/pnas.85.12.4506.

Wittmann, C. W. *et al.* (2001) 'Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles.', *Science (New York, N.Y.)*, 293(5530), pp. 711–4. doi: 10.1126/science.1062382.

Wittmann, J., Hol, E. M. and Jäck, H.-M. (2006) 'hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay.', *Molecular and cellular biology*, 26(4), pp. 1272–87. doi: 10.1128/MCB.26.4.1272-1287.2006.

Wolfe, M. S. (2009) 'Tau mutations in neurodegenerative diseases', *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), pp. 6021–6025. doi: 10.1074/jbc.R800013200.

Wollerton, M. C. *et al.* (2004) 'Autoregulation of Polypyrimidine Tract Binding Protein by Alternative Splicing Leading to Nonsense-Mediated Decay', *Molecular Cell*, 13(1), pp. 91–100. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00502-1.

Wong, H. Y. *et al.* (2009) 'DNA dependent recruitment of DDX17 and other interacting proteins by the human androgen receptor', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V., 1794(2), pp. 193–198. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.001.

Wong, J. (2013) 'Altered Expression of RNA Splicing Proteins in Alzheimer's Disease Patients: Evidence from Two Microarray Studies', *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, 3(1), pp. 74–85. doi: 10.1159/000348406.

Wortham, N. C. *et al.* (2010) 'The DEAD box protein p72 regulates ER α -/Estrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ER α positive breast cancer', 28(46), pp. 4053–4064. doi: 10.1038/onc.2009.261.The.

X

Xue, Y. *et al.* (2013) 'Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated MicroRNA circuits', *Cell*. Elsevier Inc., 152(1–2), pp. 82–96. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.045.

Y

Yamashita, A. *et al.* (2001) 'Downloaded from genesdev.cshlp.org on December 24, 2014 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press', pp. 2215–2228. doi: 10.1101/gad.913001.a.

Yamashita, A. *et al.* (2005) 'Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover', *Nature Structural and Molecular Biology*, 12(12), pp. 1054–1063. doi: 10.1038/nsmb1016.

Yamashita, A. *et al.* (2009) 'SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay', *Genes and Development*, 23(9), pp. 1091–1105. doi: 10.1101/gad.1767209.

Yang, L., Lin, C. and Liu, Z. R. (2006) 'P68 RNA Helicase Mediates PDGF-Induced Epithelial Mesenchymal Transition by Displacing Axin from β -Catenin', *Cell*, 127(1), pp. 139–155. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.036.

Yang, Y. *et al.* (2007) 'Inhibition of protein phosphatases induces transport deficits and axonopathy', *Journal of Neurochemistry*, 102(3), pp. 878–886. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04603.x.

Yao, H. *et al.* (2010) 'Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA', *Genes and Development*, 24(22), pp. 2543–2555. doi: 10.1101/gad.1967810.

Yoshiyama, Y. *et al.* (2007) 'Article Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model', pp. 337–351. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010.

Z

Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., LaDuca, J. P., *et al.* (1998) 'At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation.', *Molecular and cellular biology*, 18(9), pp. 5272–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710612>.

Zhang, J., Sun, X., Qian, Y. and Maquat, L. E. (1998) 'Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm.', *RNA (New York, N.Y.)*, 4(7), pp. 801–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710612> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC109113>.

Zhang, J. and Maquat, L. E. (1996) 'Evidence that the decay of nucleus-associated nonsense mRNA for human triosephosphate isomerase involves nonsense codon recognition after splicing.', *RNA (New York, N.Y.)*, 2(3), pp. 235–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1369366&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Zhang, Z. *et al.* (2014) 'Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease', *Nature medicine*. Nature Publishing Group, 20(11), pp. 1254–1262. doi: 10.1038/nm.3700.

Zheng, H. and Koo, E. H. (2011) 'Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein', *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/1750-1326-6-27.

Zheng, S. *et al.* (2012) 'PSD-95 is post-transcriptionally repressed during early neural development by PTBP1 and PTBP2', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 15(3), pp. 381–388. doi: 10.1038/nn.3026.

Zonta, E. *et al.* (2013) 'The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export', *Nucleic Acids Research*, 41(1), pp. 554–

564. doi: 10.1093/nar/gks1046.